

Untersuchungen zur Züchtung variegater *Pelargonium* x *zonale*-Hybriden auf tetraploider Stufe

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum horticolarum

(Dr. rer. hort.)

eingereicht an der
Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Agraringenieur Patrick Grieger,
geboren am 21. Mai 1969 in Berlin

Präsident
der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Ch. Marksches

Dekan
der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät

Prof. Dr. Dr. hc. O. Kaufmann

Gutachter:

1. Prof. Dr. F. Pohlheim
2. Dr. K. Olbricht

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2007

„I may [...] be allowed to say that the subject
[variegation in the foliage of plants]
appears to me to offer a very wide and interesting field
for scientific inquiry and research“

PETER GRIEVE

„A History of Ornamental Foliaged Pelargoniums“
London, 1868

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit züchtungsmethodischen Untersuchungen zur Schaffung blattvariegater *Pelargonium x zonale*-Hybriden auf tetraploidem Leistungsstand. Basierend auf dem Wirkstoff Trifluralin konnte eine effektive Behandlungsvariante zur somatischen Polyploidisierung periklinalchimärischer *Pelargonium x zonale*-Klone etabliert werden. Unter Ausnutzung biparentaler Erbgänge wurden fünf ausgewählte Plasmotypen an das Leistungsniveau moderner Sortimente herangeführt. Daneben erbrachten Kreuzungen innerhalb der Sektion *Ciconium* hybridvariegated F1-Pflanzen. Die Möglichkeit der Ausnutzung von Kern-Plasma-Wechselwirkungen in der Pelargonienzüchtung wird diskutiert. Im Hinblick auf den Aufbau eines Protoplastenregenerationssystems konnten Zellsuspensionskulturen etabliert werden. Im Anschluss an enzymatische Verdauungen wurde die Regeneration von Kallus beobachtet. Variegated Pflanzen aus Mutationsversuchen mit NMH (Nitroso-Methyl-Harnstoff), einer weiteren experimentellen Variante, erwiesen sich als steril, so dass eine weiterführende Züchtungsarbeit auf diesem Weg bisher noch nicht möglich war.

Abstract

The study analyzes breeding schemes concerning the development of variegated tetraploid *Pelargonium x zonale*-hybrids (*Pelargonium x hortorum*). With a focus on practical relevance breeding methods for periclinal chimeric leaf patterns are discussed. Trifluralin-induced tetraploid *Pelargonium x zonale*-hybrids were successfully crossed with modern cultivars. Via biparental mode of inheritance five defined plasmotypes were transferred to the karyological background of current high-performance *Pelargonium* series. In a crossing-program within the section *Ciconium* hybrid-variegation was detected. The possibility of using nucleo-plasmatic interactions in developing new *Pelargonium* cultivars is discussed. First steps concerning a biotechnological approach to create variegated plants included the establishment of cell-suspension-cultures as the base for a protoplast regeneration system. Following the enzymatic digestion of *Pelargonium*-liquid cultures up to now, callus regeneration was achieved. Variegated plants resulting from mutagenic treatments with NMU (Nitroso-methylurea) proved to be sterile.

Schlagwörter:

Pelargonium, Variegation, Chimäre, Ploidie

Keywords:

Pelargonium, variegation, chimera, ploidy

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Trivialbezeichnungen

APM	Amiprofos methyl, O-Methyl O-(2-nitro-p-tolyl) N-isopropylphosphoramidothionate
B5	Vitaminzusatz, GAMBORG et al. (1968)
BAP	6-Benzylaminopurine
cpDNA	Chloroplasten-DNA, Plastom
CPW	Cell and Protoplast Washing-solution, FREARSON et al. (1973)
DTD, xWG	genetische Kennzeichnung der drei äußeren Sprossscheitelschichten (L1,L2,L3), hier: Diploid, Tetraploid, Diploid; Grün oder Weiß (=x), Weiß, Grün
DMSO	Dimethylsulfoxyd
FDA	Fluorescindiaceat
g x w	Kreuzung (grün x weiß), bezogen auf die Konstitution der sporogenen L2
IAA	Indole-3-acetic acid
kbp	Kilobasenpaare
L1, L2, Ln	Bezeichnung der Sprossscheitelschichten, SATINA et al. (1940), L = Layer
MES	2-(n-Morpholino)-ethanesulfonic acid
MS	Basalmedium, MURASHIGE und SKOOG (1962)
NMH	n-Nitroso-n-Methyl-Harnstoff
PE	Polyethylen
PVP-10	Polyvinyl pyrrolidone, Molekulargewicht 10000
RHS	Royal Horticultural Society
S	SVETBERG-Einheit, Sedimentationskoeffizient
SCV	Settled Cell Volume
'[Sorte] 4x'	tetraploide Sortenvariante, bezogen auf die L2
TDZ	Thidiazuron
Trifluralin	a,a,a-Trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate
WR, WK	Weißrand, Weißkern

INHALTSVERZEICHNIS

1	PROBLEMDARSTELLUNG UND VERSUCHSANSÄTZE	7
1.1	<i>Pelargonium</i> x <i>zonale</i> , Entwicklung weißbunter Sorten	9
1.2	Variegationen bei <i>Pelargonium</i> x <i>zonale</i> , Chimärentheorie	11
1.3	Genetik extranukleärer Erbträger	14
1.4	Züchtungsmethodische Untersuchungsansätze und Fragestellungen	16
1.4.1	Chlorophylldefektmutationen	17
1.4.1.1	Einsatz von NMH	18
1.4.1.2	Plastiden-Ribosomen-Defizienz	19
1.4.2	Kombinationszüchtung	19
1.4.3	Regeneration künstlicher Mischzellen	22
1.4.4	Somatische Kombination	22
1.4.5	Molekulargenetischer Ansatz	23
1.5	Züchtung auf tetraploidem Niveau	23
1.6	<i>In vitro</i>-Kulturverfahren, Regenerationssysteme	26
1.6.1	Protoplastenkultur, Zellsuspensionen	27
1.6.2	Multiple Adventivsprossinduktion	28
2	MATERIAL UND METHODEN	29
2.1	Pflanzenmaterial	29
2.1.1	Kulturbedingungen	32
2.2	Methoden	32
2.2.1	Kreuzung	32
2.2.2	Nachweis chimärisch bedingter Laubblattvariegationen	32
2.2.3	Nachweis extranukleär codierter Chlorophylldefekte	33
2.2.4	Polyploidisierungsversuche	33
2.2.4.1	Mutagenbehandlung	33
2.2.4.2	Ploidienachweise	34
2.2.5	TDZ-Gießversuch zur Adventivsprossregeneration	36
2.2.6	<i>In vitro</i> -Kulturverfahren	36
2.2.6.1	Sterilaussaat und Überführung	36
2.2.6.2	Multiple Sprossbildung unter TDZ-Einfluss	37
2.2.6.3	<i>In vitro</i> -Veredelungen	37
2.2.6.4	Aufbau von Kallussuspensionen	37
2.2.6.5	Protoplastenkultur	38
2.2.7	Antibiotikabehandlungen	40
2.2.8	Statistik und EDV	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Diploides Ausgangsmaterial	41
3.1.1	Chimärische Konstitution	41
3.1.2	Testkreuzungen mit variegaten <i>Pelargonium</i> x <i>zonale</i> -Sorten	42
3.2	Polyploidisierung	46
3.2.1	Polyploidisierung der L2	48
3.2.2	Polyploidisierungen von L1 und L3	53

3.3 Kreuzung polyploidisierter Weißbrandformen auf tetraploider Stufe	58
3.3.1 Histogenese periklinalchimärischer Plasmavarianten auf tetraploider Ebene	63
3.4 Hybridvariegation	65
3.4.1 Kreuzung von <i>Pelargonium zonale</i> 4x mit aktuellen Sorten	65
3.4.2 Kreuzungen aktueller Sorten mit hybridvariegatem Ausgangsmaterial	66
3.5 TDZ-Gießversuch	67
3.6 Antibiotikabehandlungen	68
3.7 Versuche zur somatischen Kombination	69
3.8 Adventivsprossinduktion <i>in vitro</i>	69
3.9 <i>Pelargonium</i>-Zellsuspensionen	70
3.10 Protoplastenkultur	71
3.11 Bonitur NMH-behandelter Versuchspflanzen	73
4 DISKUSSION	75
4.1 Zuchtziel „tetraploide Stufe“	75
4.2 Kombinationszüchtung	77
4.3 Chimärische Konstellationen auf tetraploider Ebene	78
4.4 Quantitative Parameter biparentaler Erbgänge	83
4.5 NMH-induzierte Plastommutationen	85
4.6 Antibiotikabehandlung	87
4.7 Polyploidisierung	90
4.8 Hybridvariegation	93
4.9 Somatische Kombination	97
4.10 <i>In vitro</i> -Kulturverfahren	98
4.10.1 Multiple Sprossregeneration	98
4.10.2 Künstliche Mischzellen	100
5 ZUSAMMENFASSUNG	103
6 LITERATURVERZEICHNIS	105
7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	124
8 TABELLENVERZEICHNIS	127

1 Problemdarstellung und Versuchsansätze

Die Verdopplung genetischer Information - sei es auf der Basis einzelner genetischer Abschnitte oder auch kompletter genetischer Einheiten - kann als ein fundamentaler Prozess evolutionärer Entwicklung gewertet werden. Moderne molekulargenetische Analysemethoden erschließen erst in den letzten Jahren zunehmend ein überraschendes Ausmaß an genetischer Redundanz in pflanzlichen Genomen.

Nach neuesten Schätzungen dürfte der Anteil polyploider Spezies unter den Angiospermen bei weit über 50 % liegen. Für polyploide Sippen konnte eine überlegene Anpassungsfähigkeit an extreme Standorte belegt werden; unter den 21 „world top crops“ (auf der Basis der weltweiten Anbaufläche) befinden sich 15 polyploide Nutzpflanzenarten (BENNETT 2004, SOLTIS et al. 2003). Neben den natürlichen Selektionsdruck an Extremstandorten und die unbewusste Auslese überlegener, polyploider Typen durch unsere Vorfahren gesellt sich seit Anfang des 20. Jahrhunderts die gezielte, wissenschaftlich fundierte Beeinflussung des Ploidiegrades von Versuchspflanzen. WINKLER (1916) erkannte bei seinen Arbeiten zur Schaffung von „Pfropfbastarden“ die genetische Konstitution einzelner Kallusregenerate als „polyploid“ und prägte damit den Begriff. Der Einsatz chemischer Mitoseinhibitoren mit dem Ziel der Valenzerhöhung kann bis auf BLAKESLEE und AVERY (1937) zurückgeführt werden, die erstmals die mutagene Wirkung von Kolchizin experimentell nutzten.

Die überlegenen vegetativen Eigenschaften polyploidisierter Pflanzen werden unter anderem im Zierpflanzenbau besonders geschätzt. Tetraploide Pflanzen zeichnen sich gegenüber ihren diploiden Vorläufern häufig durch züchterisch erwünschte Merkmale aus. Nach der Einführung „neuer“ Zierpflanzenarten wird deren Polyploidisierung als vielversprechender und überschaubarer Züchtungsschritt betrachtet, innerhalb des Spektrums etablierter Zierpflanzengattungen erweitern Valenzanpassungen verwandter Arten das kombinierbare Ausgangsmaterial (VAN TUYL und LIM 2003). Eine von KUCKUCK (1979) zusammengestellte Liste polyploider Zierpflanzen umfasst nahezu alle heute wirtschaftlich relevanten Gattungen.

Es sind überwiegend tetraploide Vertreter der Gattung *Pelargonium*, die in Deutschland mit einem Produktionsflächenanteil von über 25 % und ca. 175 Millionen produzierten Pflanzen (ANONYM 2005) den Markt der Beet- und Balkonpflanzen dominieren. Für *Pelargonium x zonale* wird das spontane Auftreten erster polyploider Formen auf das Jahr 1870 datiert (CLIFFORD 1970), stecklingsvermehrte grünlaubige Zonale-Hybriden werden heute nahezu ausschließlich auf tetraploidem Niveau angeboten. Eine Ausnahme bildet die Gruppe der weißbunten, blattvariegaten *Pelargonium x zonale*-Hybriden, die einen vergleichsweise vernachlässigten Züchtungszustand aufweisen. In diesem Segment beherrschen alte, diploide Sorten den Markt, von denen sich der überwiegende Teil bis in das 19. Jahrhundert zurückverfolgen lässt (Abb. 1, Tab. 1). Sortenprüfungen bescheinigen weißbunten Pelargonien ein ungünstiges Wuchsverhalten von „kräftig und ausladend“ (‘Wilhelm Langguth’) bis hin zu „sparrig und nicht sonderlich gleichmäßig“ (‘Mrs Pollock’) (LOLIES 2002). Die im tetraploiden Sortiment eingeführten violetten Blütenfarbtöne sucht man in Kombination mit Blattrandmustern bislang vergebens, hinsichtlich der Blütengröße erreichen variegata Sorten bei weitem nicht den

Züchtungsstand aktueller (halb-) gefüllter, grünlaubiger Varianten.

Mit der Diversifizierung der Angebotspalette in den letzten Jahren finden sich Schmuckblattpelargonien in den Katalogen vieler großer Züchtungsbetriebe. Alte weißbunte Sorten werden auf der heute üblichen, phytosanitär einwandfreien Basis angeboten (pac® clean, pac® Elsner Jungpflanzen 1998) und teilweise mit exotischen Namen versehen ('Exotica Bicolor Red' = 'Wilhelm Langguth', FISCHER 2001). Als einzige „Neuzüchtung“ bewährt sich die spontan entstandene Weißrandvariante 'pac® Melosilver' seit 1999 am Markt. Diese einzigartige tetraploide Zonalpelargonie stellt auf Grund ihrer Sterilität jedoch eine kombinationszüchterische Sackgasse dar (Abb. 2).

Tabelle 1 *Pelargonium x zonale*, verbreitete blattvariegated Sorten und ihr Ursprung


	Sorte	Entstehung
	'Flower of Spring'	Kinghorn, GB, 1848 (1,4)
	'Mrs Pollock'	Grieve, GB, 1858 (1)
	'Sophie Dumaesque'	vor 1868 (1)
	'Crystal Palace Gem'	GB, vor 1868 (1)
	'Freak of Nature'	Cannell, GB, 1870 (in CHITTENDEN 1926)
	'Mme Salleron'	Salleron, F, 1877 (in BERGANN und BERGANN 1959)
	'A Happy Thought'	Lynes, GB, 1877 (3)
	'Mr Henry Cox'	Cannell, GB, 1879 (2)
	'Mrs Parker'	Parker, GB, 1880 (4)
	'Wilhelm Langguth'	D, 1898 (in JAMES 2002)
	'Contrast'	Merry Gardens, USA 1950 (3)
	'Frank Headley'	Headley, GB, 1957 (2,3)
	'Melosilver'	pac® Elsner Jungpflanzen, D, 1999 (persönliche Kommunikation)

Abbildung 1 'Mrs Pollock', in einer Abbildung von 1862, Flores des Serres, 15

Quellen: (1) GRIEVE 1868; (2) in CLARK 1988; (3) in BAGUST 1988; (4) in CLIFFORD 1970

Aus der Sicht von Pelargonienkonsumenten sind neben der Blütenfarbe und dem Preis Laubblattmerkmale ein wesentliches Kaufkriterium (BEHE und NELSON 1999). Auf Züchterseite versprechen moderne tetraploide Schmuckblattpelargonien eine Anpassung an aktuelle grünlaubige Sortimente, die sich in den vergangenen Jahren zunehmend an den wirtschaftlichen Anforderungen der Erzeuger orientieren (BEECK 1993). Für die produktionsrelevanten Eigenschaften wie Vermehrungszyklus, Verzweigungsmuster, Wuchshöhe, Stellfläche und Blütetermin besteht demnach züchterischer Handlungsbedarf. **Die Schaffung buntlaubiger *Pelargonium x zonale*-Hybriden auf dem Leistungsstand moderner tetraploider Sorten kann also sowohl aus Verbraucher- als auch aus Produzentensicht als praxisrelevantes Züchtungsziel formuliert werden.**

1.1 *Pelargonium x zonale*, Entwicklung weißbunter Sorten

Die Gattung *Pelargonium* L'HÉR. ex AITON („Pelargos“, griechisch: „Storch“) umfasst über 270 Arten, deren Herkunft sich von wenigen Ausnahmen abgesehen auf das südliche Afrika beschränkt. Innerhalb der taxonomisch wiederholt überarbeiteten Gattung werden heute bis zu 16 Sektionen unterschieden, wobei die wirtschaftlich wichtigen *Pelargonium x zonale*-Hybriden (neu: „Pelargonium Zonale-Gruppe“ (ERHARDT et al. 2002) = *P. x zonale*) ihren Ursprung in der Sektion *Ciconium* haben. Morphologische Betrachtungen sowie molekulargenetische Untersuchungen weisen die Beteiligung der Arten *Pelargonium zonale* sowie *Pelargonium inquinans* an der Entstehung der modernen Kultivare nach. Die Einkreuzung weiterer Vertreter des Formenkreises (*P. scandens*, *P. hybridum* und andere) gilt nicht zuletzt auf Grund der ausgeprägten interspezifischen Kombinierbarkeit innerhalb der Gattung als wahrscheinlich (JAMES et al. 2004, BAKKER et al. 1999, 2000, HORN 1994, HARNEY 1976).

Bereits um das Jahr 1700 erreichte *P. zonale* Europa, *P. inquinans* wird 1710 in Leiden, NL beschrieben. Eine dort zehn Jahre später auftretende variegated Form gilt nach WIMMER (2001) als „erste in Kultur entstandene Pelargonienart“. Der heute nur noch aus Abbildungen bekannte Klon wird noch vor der Mitte des 18. Jahrhunderts in ganz Europa verbreitet (1724 Berlin, 1734 London, Paris). Ein Jahrhundert später führt REIDER (1829) in seiner „Beschreibung aller bekannten Pelargonien [...]“ insgesamt sieben variegated „*P. zonale*“-Varianten auf, ohne dass deren Herkunft genauer beschrieben wird. Zu dieser Zeit belief sich die Zahl der grünlaubigen Hybriden bereits auf über 1000 (WIMMER 2002). Insbesondere in England führte der „Run“ auf panaschierte Sorten um 1850 zu einer erstaunlichen Vielfalt variegated Typen (einige 100 Kultivare), die Popularität weißbunter Pelargonien spiegelt sich in GRIEVES 1868 veröffentlichter Monografie, „A History of Ornamental Foliaged Pelargoniums“, wider. Die heute wohl bekannteste variegated Sorte, 'Mrs Pollock', stammt aus dieser Epoche (GRIEVE 1868). Ihr Ursprung liegt in der Sorte 'Golden Chain', die GRIEVE auf einen Sport an *Pelargonium inquinans* zurückführt, der bereits 1822 in Kultur war.

Die beachtliche züchterische Weiterentwicklung des grünlaubigen Sortiments im 19. Jahrhundert lässt sich mit zeitlicher Verzögerung auch bei den weißbunten Laubblattvarianten beobachten. Knapp 20 Jahre nach dem Auftreten erster grüner Formen mit gefüllten Blüten kamen 1880 mit 'Mrs Parker' und 'Eva Fish' zwei gefüllt blühende Weißrandvarianten auf den Markt. Die Blütenfarbe weiß ist heute im variegated Sortiment ebenso anzutreffen wie „Rosebud“-Typen oder „Miniatur“-Formen. Mit der Schaffung moderner grünlaubiger Sorten auf tetraploider Basis seit Mitte des 20. Jahrhunderts ist diese Coentwicklung der Sortimente offenbar zum Erliegen gekommen. Zu den aktuellen Hochleistungssorten existieren, mit einer Ausnahme (s.u.), keine analogen Weißrandtypen. Die 1957 entstandene diploide Variante 'Frank Headley' (in BAGUST 1988) muss heute als eine der modernsten Kultivare bezeichnet werden. Als bislang einzige Weißrandform wurde sie in das Sortiment der „Proven Winners®“ aufgenommen.

Die spontane Entstehung von Weißrandvarianten ist für die Gruppe der *Pelargonium*-Hybriden vereinzelt dokumentiert. Neben 'Golden Chain' (GRIEVE 1868) und einer von CLIFFORD (1970) erwähnten Form, 'Silver Kewense', kann hier auf 'Little Dandy' und 'Mangle's variegated' (in

BERGANN und BERGANN 1959) verwiesen werden. MÖHRING (1949) erwähnt einen gelbbunten Sport von 'Meteor', einer Anfang des 20. Jahrhunderts weit verbreiteten Sorte.



Abbildung 2 'Melosilver', Katalogabbildung, pac® Elsner Jungpflanzen

Die eingangs angeführte Sorte 'pac® Melosilver' konnte bei pac® Elsner Jungpflanzen, Dresden als spontane Sprossvariante aus der aktuellen Sorte 'pac® Melody' ausgelesen werden. Als bislang einziger tetraploider Vertreter innerhalb der Gruppe der weißbunten *Pelargonium x zonale*-Hybriden setzt sie Maßstäbe für die Entwicklung eines modernen variegaten Sortiments (Abb. 2).

Unter wissenschaftlichen Gesichtspunkten wird die Induzierung von Chlorophylldefekten bei *Pelargonium x zonale* vereinzelt dargestellt:

Nach Mutationsexperimenten konnte die Entstehung von Laubblattvarianten an der monohaploiden Form 'Kleiner Liebling' festgehalten werden, die als „Testsystem für Mutagene“ gilt (POHLHEIM, E. 1977,

POHLHEIM et al. 1972). Weißrandformen, hervorgegangen aus 'Kleiner Liebling', werden bis heute gehandelt. Die außerordentlich schwach wüchsigen und sterilen Pflanzen besitzen allerdings als Miniaturpelargonien nur einen Liebhaberwert. HAGEMANN (1976) berichtet beiläufig von erfolgreichen Versuchen zur Schaffung von Chlorophyllvarianten über Mutagenbehandlungen von Stecklingen. Zierwert und Ploidiestatus des geschaffenen Materials bleiben jedoch offen.

Nach interspezifischen Kreuzungen auftretende Chlorophylldefekte (Bastardscheckung, Hybridvariegation, HAGEMANN 2000, KIRK und TILNEY-BASSETT 1978) konnten METZLAFF et al. (1982) sowie POHLHEIM (1986) über die Kombination ausgesuchter Kreuzungspartner innerhalb der Sektion *Ciconium* gezielt reproduzieren. Die praktische Verwertung der diploiden Kreuzungsprodukte stand jedoch nicht im Vordergrund dieser Arbeiten. Dem gegenüber zahlreich sind die Publikationen, die sich mit Kreuzungen bestehender diploider Weißrandformen aus (histo-)genetischem wie cytologischem Blickwinkel befassen (AMOATEY und TILNEY-BASSETT 1994, HAGEMANN und SCHOLZE 1974, RENNER 1936a+b, ROTH 1927, BAUR 1909, Überblick in: HAGEMANN 2000). Die gartenbauliche Weiterverwendung des geschaffenen Materials war jedoch von keinem der Autoren beabsichtigt. Flankiert werden die Kreuzungsstudien mit variegaten Pelargonien von chemisch/molekularbiologischen Analysen bestehender Chlorophylldefekte (STEINER et al. 1988, METZLAFF et al. 1981, BÖRNER et al. 1972, 1973, HERRMANN und HAGEMANN 1971). **Insgesamt kann festgehalten werden, dass praxisorientierte züchterische Versuche zur Etablierung weißbunter *Pelargonium x zonale*-Formen auf tetraploider Stufe bis heute nicht vorliegen.** Die Überwindung des weit über 50 Jahre andauernden Stillstandes (Ausnahme: 'Frank Headley', 1957) in der Entwicklung blattvariegater *Pelargonium x zonale*-Hybriden durch die experimentelle Schaffung erster tetraploider Varianten ist das vorrangige Ziel der vorliegenden Arbeit.

1.2 Variegationen bei *Pelargonium x zonale*, Chimärentheorie

Variegationen, „discrete patterns of different colors“ (MARCOTRIGIANO 1997), also Farbkombinationen in Blüten- oder Laubblättern bilden auf Grund ihrer unbestrittenen Attraktivität einen wesentlichen Schwerpunkt in der Zierpflanzenzüchtung. Für die Gattung *Pelargonium* konnten die genetischen, histologischen und physiologischen Ursachen einer ganzen Reihe von Blüten- und Laubblattmusterungen wissenschaftlich geklärt werden (Tab. 2, Erläuterungen im Text).

Tabelle 2 Variegationsursachen innerhalb der Gattung *Pelargonium*

Sorte	Muster	Ursache	Autor
'Mapping', 'Mrs Pollock' und viele andere	Kern-Rand-Muster auf Laubblättern	periklinalchimärische Konstitution, extranukleärer Erbgang	BAUR 1909, HERRMANN und HAGEMANN 1971
'Koshinohomare'	Sektoren auf Laubblättern	spontane Mutante aus grüner Form	IMAI, 1936
'Mme Salleron'	Kern-Rand-Muster auf Laubblättern	trichimärische Konstitution, Wuchshemmung	BERGANN und BERGANN 1959
'A Happy Thought'	Kern-Rand-Muster auf Laubblättern	periklinalchimärische Konstitution, Partnerinduktion, Allele G/p	TILNEY-BASSETT 1963b, POHLHEIM und RÖSSEL 1989
'Crystal Palace Gem', 'Cloth of Gold'	Kern-Rand-Muster auf Laubblättern	periklinalchimärische Konstitution, Allele G/g bzw. Aur/Aur+	TILNEY-BASSETT 1963b, HERRMANN und HAGEMANN 1971
'Mrs Parker', 'Flower of Spring'	Kern-Rand-Muster auf Laubblättern	periklinalchimärische Konstitution, extranukleärer Erbgang, Plastiden-Ribosomen-Defizienz	BÖRNER et al. 1973, 1972
'Freak of Nature'	Kern-Rand-Muster auf Laubblättern	trichimärische Konstitution, Plastiden-Ribosomen-Defizienz, Wuchshemmung	BÖRNER et al. 1973, POHLHEIM 1983, 1977, 1973
'Crocodile', (<i>P. x peltatum</i>)	Leitgefäßaufhellung im Laubblatt	Infektiös, PNVA : pelargonium net vein agent (auch bei <i>P x zonale</i>)	CASSELLS et al. 1980
'Mexikana' (<i>P. x peltatum</i>)	Kern-Rand-Muster in der Blüte	Infektiös, PPSA: pelargonium petal streak agent (auch bei <i>P x zonale</i>)	CASSELLS und MINAS 1983
'Verona'	gepunktete Petalen, gefärbte Trichombasiszellen auf Blüten, goldfarbenes Laub	Allele Rst/rst, Aur+/Aur	BAUR 1907 in BADR und HORN 1971b, ALMOUSLEM und TILNEY-BASSETT 1989
'Mr. Wren', 'Rosa Liebling', 'Pink Happy Thought', 'Pink Ice', 'Lila Luisenhof' (<i>P. x peltatum</i>)	Kern-Rand-Muster in der Blüte	periklinalchimärische Konstitution, Partnerinduktion	POHLHEIM und RÖSSEL 1989, PLASCHIL et al. 2003, OLBRICHT et al. 2006
'Lady Alice of Valencia'	Picotee (gesprenkelte Blütenblattränder)	Allele Pi/pi	NASSER und TILNEY-BASSETT 1992
'Jay', 'Andromeda', 'Snowstorm'	Färbungen der Blütenblattbasis	Allele R/r, Ba/ba, Ce/ce, Ve/ve Rm/rm	NASSER und TILNEY-BASSETT 1992
'Dolly Varden', 'Preston Park'	rote Zone auf Laubblättern	Allele Zo ¹ /Zo ⁰ /Zo ⁰ /Zo ^{nm} /Zo ^{nm} /zo	AMOATEY und TILNEY-BASSETT 1993
'Eggshell'	punktierte Blütenblätter	genetisch instabiler Zustand	OLBRICHT et al. 2006

Herausragende Bedeutung erlangten dabei die Untersuchungen von ERWIN BAUR (1909), in denen fundamentale Erkenntnisse zur Chimärentheorie mit Aussagen zur extranukleären und biparentalen Vererbung kombiniert werden konnten. **Die geschichtete Anordnung unterschiedlicher Plasmotypen im Sprossscheitel adulter Pflanzen zum einen und die somatische Segregation extranukleärer Erbträger ausgehend von einer zygotischen Mischzelle zum anderen bilden die beiden wesentlichen theoretischen Grundlagen für die vorliegenden experimentellen Arbeiten zur Schaffung moderner buntlaubiger *Pelargonium x zonale*-Hybriden.**

Nach STEWART et al. (1974) sind am Aufbau des Pelargonienlaubblattes in der Regel Abkömmlinge der drei äußeren Sprossscheitelschichten beteiligt. Während Deszendenten der apikalen L1 (L für engl.: Layer nach SATINA et al. 1940) vorwiegend die Epidermis bilden, wird wenigstens eine subepidermale Zellschicht auf die zweite apikale Zelllage zurückgeführt. Zum Blattrand hin beteiligen sich Abkömmlinge der L2 auch am Aufbau des Mesophylls, das sonst von L3-bürtigen Zellen gebildet wird. Tragen L2 und L3 unterschiedliche Farbmarkierungen, so ist die Beteiligung von L2- und L3-Deszendenzen am Aufbau des Laubblattes in Form charakteristischer Kern-Rand-Muster in der Blattaufsicht klar erkennbar (Abb. 3). Pflanzen mit nachweisbar stabiler Sprossscheitelschichtung werden als intraapikale Heterohistonten oder Periklinalchimären bezeichnet (TILNEY-BASSETT 1986, BERGANN und BERGANN 1959).

Während für Kern-Rand-Musterungen im Bereich der *Pelargonium*-Blüte auch karyogenetische und infektiöse Ursachen ausgemacht werden konnten, sind Mustergene, die chimärische weiß-grüne Laubblattmusterungen „imitieren“ könnten, innerhalb der Gattung unbekannt. Gleiches gilt für anatomisch bzw. physiologisch

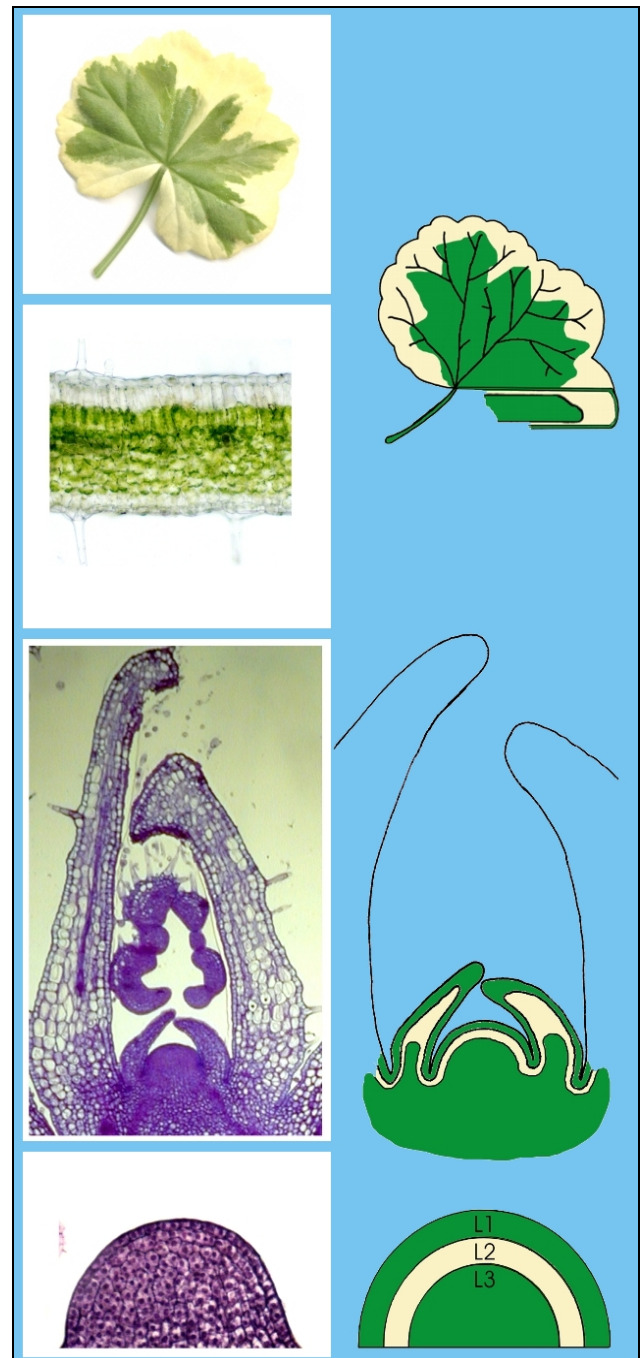


Abbildung 3 Übersicht: *Pelargonium*, Sprossscheitel- und Laubblattaufbau (Erläuterungen im Text)

hervorgerufene Variegationen, die in anderen Taxa nachgewiesen wurden (MARCOTRIGIANO 1997, KIRK und TILNEY-BASSETT 1978). **Das Züchtungsziel, die Schaffung tetraploider Weißrandpelargonien, muss in erster Linie unter Ausnutzung periklinalchimärischer Sprossscheitelkonstitutionen und daraus resultierender Laubblattvarianten verfolgt werden.**

Neben chimärischen Blütenmustern (OLBRICHT et al. 2006, PLASCHIL et al. 2003, POHLHEIM und RÖSSEL 1989) gehören Laubblattmusterungen innerhalb der Gattung *Pelargonium* zu den histologisch eingehend untersuchten Variegationen. Insbesondere vom dargestellten „Normalfall“ abweichende Gewebekompositionen und Musterbilder waren Ziel wissenschaftlicher Forschungsarbeiten. Ein atypischer Histogeneseverlauf konnte für die *Pelargonium*-Hybride ‘Freak of Nature’ nachgewiesen werden (POHLHEIM 1973, 1977 und 1983). Die breiten grünen Laubblattränder dieser Sorte sind auf eine genetisch grüne L1 zurückzuführen, die in Folge einer chlorophylldefekten und im Wachstum gehemmten zweiten apikalen Lage Blattrandmesophyll hervorbringt. Ein ebenfalls untypisches, auf eine chimärische Konstitution zurückzuführendes Laubblattmuster besitzt die Hybride ‘A Happy Thought’. Das chlorophylldefekte L3-bürtige Mesophyll ist hier für ein auffallend helles Binnenfeld verantwortlich. Anders als im Regelfall, in dem helle Binnenfelder von grünen L2-Deszendents überlagert (=maskiert) werden, hemmt hier das farbdefekte Gewebe die Chlorophyllsynthese in den benachbarten Zellen (partnerinduktive Hemmwirkung). Bereiche, in denen die genetisch grüne Palisadenschicht von L3-bürtigen Zellen untersetzt ist, bleichen aus, resultierend in einem „unmaskierten Binnenfeld“ (BERGANN 1962b, POHLHEIM und RÖSSEL 1989). Die sterile Pelargonien-Sorte ‘Mme Salleron’ kombiniert als „Trichimäre“ in ihren Sprossspitzen drei genetische Idiotypen. Diese mehrfache Markierung der drei apikalen Gewebeschichten erlaubte BERGANN und BERGANN (1959 und 1962) Umlagerungs-, Entmischungs- und Vervielfältigungsprozesse im mehrschichtigen Sprossspitze zu verfolgen.

Die „doppelte Markierung“ von Gewebeschichten gilt heute als wichtige Methode der Heterohistontenanalyse (POHLHEIM 2004, OLBRICHT 1998). Mit der zusätzlichen Polyploidisierung einzelner Gewebeschichten periklinalchimärischer Zierpflanzen ist - über die Analyse von Mustern hinaus - die Möglichkeit der züchterischen Beeinflussung von Musterproportionen gegeben. Die Untersuchung auffälliger Blattvariegationen offenbart mitunter die (unbewusste) Selektion cytochimärischen Materials in der züchterischen Praxis (*Sansevieria*, POHLHEIM 2004; *Hosta*, ZONNEVELD und VAN IREN 2000). Proportionsverschiebungen periklinalchimärischer Blattmusterungen in Folge einer zusätzlichen cytologischen Markierung wurden an der Humboldt-Universität zu Berlin in weiteren Gattungen experimentell nachgewiesen (*Angelonia*, *Saintpaulia*, PLASCHIL et al. 2003, *Plectranthus*, MONTEIRO 2002; *Petunia*, OLBRICHT 1998; *Verbena*, PLASCHIL 1997, *Pelargonium*; POHLHEIM und RÖSSEL 1989; *Soleirolia*, POHLHEIM und IDELBERGER unveröffentlicht).

1.3 Genetik extranukleärer Erbträger

In der heute unbestrittenen phagotrophen Aufnahme photoautotropher Cyanobakterien durch eukaryotische Zellen liegt der Ursprung der als „semieautonom“ zu bezeichnenden Plastiden. Im Verlauf der evolutionären Entwicklung gingen in den Chloroplasten ca. 90 % der genetischen Information verloren bzw. wurden in den Zellkern transferiert, so dass die Teilungsfähigkeit der Zellorganellen nur in obligater Symbiose mit der Restzelle erhalten blieb (Überblick: STOEBE und MAIER 2002). Die Struktur der genetischen Information in den Plastiden und ihre Verarbeitung in Wechselwirkung mit kerncodierten Transkriptionsfaktoren ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten (HEINHORST et al. 2004, MAIER und SCHMITZ-LINNEWEBER 2004).

Das Plastom erinnert in seiner Struktur an die prokaryotischen Vorläufer. Wohl überwiegend ringförmige ptDNA-Moleküle liegen in bis zu 20000 Kopien pro Mesophyllzelle vor. Die ptDNA ist in Nukleoiden zusammengefasst, von denen ein Plastid um die 20 enthalten kann. Die je nach Zelltyp und Entwicklungsstadium schwankende Zahl der Plastiden kann im Laubblatt über 100 pro Zelle betragen (HEINHORST und CANNON 1993). BUTTERFASS (1979) belegt eine enge Korrelation zwischen dem Ploidiegrad somatischer Gewebe und der Zahl der Chloroplasten je Zelle, während die Korrelation der Chloroplastengröße mit der Chromosomenanzahl umstritten bleibt. Mit ersten Plastomsequenzierungen (SHINOZAKI et al. 1986 (*Nicotiana*), JANSEN et al. (2005) fassen 44 Taxa zusammen) offenbarte sich eine überraschend stark konservierte genetische Struktur der cpDNA innerhalb der Angiospermen. Im nur ca. 100 Gene umfassenden (ca.150 kbp) Plastom höherer Pflanzen liegen Gene für ribosomale Untereinheiten, sämtliche tRNAs sowie Anlagen für die Photosysteme I und II (PALMER 1991). Für *Pelargonium* ließen sich atypische Duplikationen und Inversionen nachweisen, resultierend in einem ungewöhnlich umfangreichen Plastom (217-241 kbp) (PALMER 1985, PALMER et al. 1987).

Aufbauend auf den fundamentalen Arbeiten ERWIN BAURs (1909) konnten ausgedehnte Kreuzungsanalysen quantitative Parameter plasmatischer Erbgänge, d.h. der Weitergabe von Zellorganellen an die Tochtergeneration aufklären (AMOATEY und TILNEY-BASSETT 1994, TILNEY-BASSETT et al. 1992, HAGEMANN und SCHOLZE 1974, ROTH 1927, Zusammenfassungen: HAGEMANN 2000, KIRK und TILNEY-BASSETT 1978). Die von BAUR (1909) postulierten Aussagen zur extrachromosomalen, biparentalen Vererbung innerhalb der Gattung *Pelargonium* sind heute cytologisch (KUROIWA et al. 2002, 1993, GUO und HU 1995; HERRMANN und HAGEMANN 1971) und molekulargenetisch (JAMES et al. 2001; METZLAFF et al. 1981) abgesichert. Nach der Befruchtung kann es in der Zygote zu einer Addition plasmatischer Erbträger beider Elternteile kommen, deren Verteilung im Verlauf der mitotischen Zellteilung Deszendenzten dreier unterschiedlicher extrachromosomaler genetischer Konstitutionen ermöglicht (maternal, paternal, biparental). Tragen die Plasmen von Kreuzungspartnern unterschiedliche Farbmarkierungen, ist also das Plastom eines Elternteils für einen Chlorophylldefekt verantwortlich, so können im Sämling Sektoren unterschiedlicher Färbung auftreten. Besetzten farbmarkierte Sektoren einzelne Schichten im sich entwickelnden mehrschichtigen Sprossscheitel der Jungpflanze, so kommt es zur Herausbildung charakteristischer histogenetisch bedingter Kern-Rand-Muster (Abb.4). „Nicht-mendelnde“

Erbgänge, somatische Segregation sowie der Nachweis von Mischzellen gelten (v.a. in Kombination) als sichere Indizien für extranukleär codierte Merkmale (HAGEMANN 1982, KIRK und TILNEY-BASSETT 1978).

Innerhalb der Gruppe der *Pelargonium x zonale* - Hybriden existieren Sorten mit Chlorophylldefekten, für die Kerngene verantwortlich gemacht werden. Eine Literatursichtung macht jedoch deutlich, dass der überwiegende Teil der beschriebenen *Pelargonium*-Laubblattvarianten auf extranukleäre Veränderungen zurückgeführt werden kann (Tab. 3).

Die biparentale Weitergabe von Mitochondrien konnte für *Pelargonium* ebenfalls cytologisch dokumentiert werden (GUO und HU 1995, KUROIWA et al. 1993). Vergleichbar den Plastiden verfügen die Mitochondrien über ein semieautarkes Subgenom innerhalb der Pflanzenzelle.

Die Struktur der genetischen Information in den Mitochondrien ist jedoch vergleichsweise komplex. Bei nachgewiesenen Größenordnungen zwischen 200 und 2000 kbp herrscht bislang Unklarheit über Konformation und Organisation der DNA-Stränge in den Organellen. Die Zahl der Mitochondrien korreliert eng mit dem Energiebedarf pflanzlicher Zellen, liegt insgesamt jedoch wohl höher als die der Plastiden. Genetisch veränderte Mitochondrien können Auswirkungen auf den Plastidenphänotyp besitzen und damit Laubfärbungen beeinflussen (Zea: NCS, (nonchromosomal stripe) in HEINHORST et al. 2004, MACKENZIE und MCINTOSH 1999, *Nicotiana*: BONNETT et al. 1993). Innerhalb der Gattung *Pelargonium* sind vergleichbare Varianten bislang nicht bekannt.

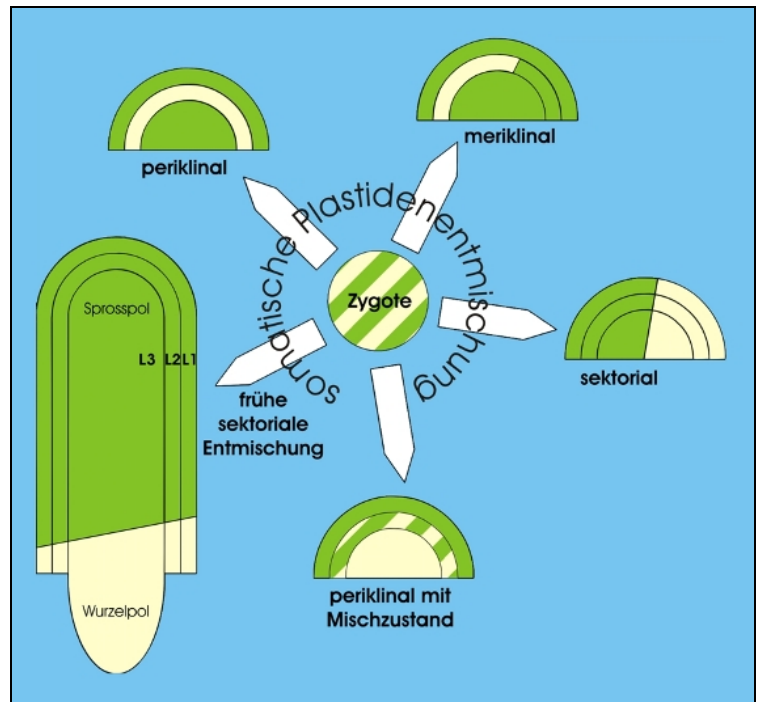


Abbildung 4 Entmischungsvarianten aus einer zygotischen Mischzelle, Variantenkombinationen (unten, mittig) sind möglich (siehe auch 1.6.2)

Tabelle 3 *Pelargonium x zonale*, genetisch untersuchte chlorophylldefekte Sorten

Plastomvariante	Quelle	Karyotyp	Quelle
'J.C. Mapping', 'Mrs Lennox', 'Snowflake'	BAUR 1909	'Verona'	BAUR 1907 in BADR und HORN 1971b
'Freak of Nature'	CHITTENDEN 1926	'Crystal Palace Gem' 'Goldem Harem', 'A Happy Thought'	TILNEY-BASSETT 1963b
'Scarlet Gem', 'Tricolor'	ROTH 1927	'Cloth of Gold'	HERRMANN und HAGEMANN 1971
verschiedene japanische Sorten	IMAI 1936	*) 'Madame Salleron' (entstanden 1877) kann auf eine Mutation in der L3 von 'Mangles Variegated' (= <i>P. zonale manglesii</i> , 1855) zurückgeführt werden (in BERGANN und BERGANN 1959). GRIEVE (1868) dokumentiert variegated Nachkommenschaften unter Verwendung von 'Mangles Variegated' als Pollenspender und weist auf die geringe Fertilität der Variante hin. DAKER (1969) führt die Sterilität von 'Madame Salleron' auf Aneuploidie in der L3 zurück (2n=17) (Wurzelspitzenpräparate von zwei verschiedenen Akzessionen). Ein für die farbintakte L3 nachgewiesener Chromosomenverlust kann als Ursache für den Chlorophylldefekt in der L2 ausgeschlossen werden.	
'Gnom', 'Madame Salleron' *, 'Greifswald'	BÖRNER et al. 1973 (Vermutung)		
'Mrs Pollock', 'Mrs Parker'	HAGEMANN und SCHOLZE 1974		
'Foster's Seedling', 'Flower of Spring', 'Dolly Varden', 'Lass O' Gowrie', 'Miss Burdette Coutts'	TILNEY-BASSETT 1976		
'Rubin Whitesporting'	STEINER et al. 1988		

1.4 Züchtungsmethodische Untersuchungsansätze und Fragestellungen

Ein nicht geringer Teil der Chimärenforschung basiert auf Versuchsobjekten aus dem Zierpflanzensektor. In der Regel spontan entstandene Laubblatt- und Blütenvarianten liefern das farbmarkierte Basismaterial für vorwiegend wissenschaftliche Untersuchungen. Die langjährige vegetative Vermehrung klonaler Sorten führt in der Praxis über zufällige Mutationen nicht selten zu chimärischen Sprossvarianten mit abweichenden Eigenschaften (BERGANN 1967). Erkenntnisse aus der Beschäftigung mit Chimären liefern dem Zierpflanzenbau Strategien zur Vermeidung bzw. Entmischung dieser Varianten. Umgekehrt werden die Möglichkeiten der gezielten Synthese und Manipulation von Laub- und Blütenmustern chimärischer Natur in der züchterischen Praxis offensichtlich vernachlässigt (BURGE et al. 2002). Die Arbeit mit Laubblattmustern bietet insbesondere innerhalb der Gattung *Pelargonium*, basierend auf den fundamentalen Erkenntnissen ERWIN BAURs (1909), eine ganze Fülle experimenteller Ansatzpunkte. Mit der Etablierung moderner Sterilarbeitstechniken erweitert sich das methodische Spektrum zusätzlich. Abbildung 5 fasst Ansätze zur Schaffung periklinalchimärischer Laubblattvarianten zusammen, sie werden im Anschluss detailliert vorgestellt.

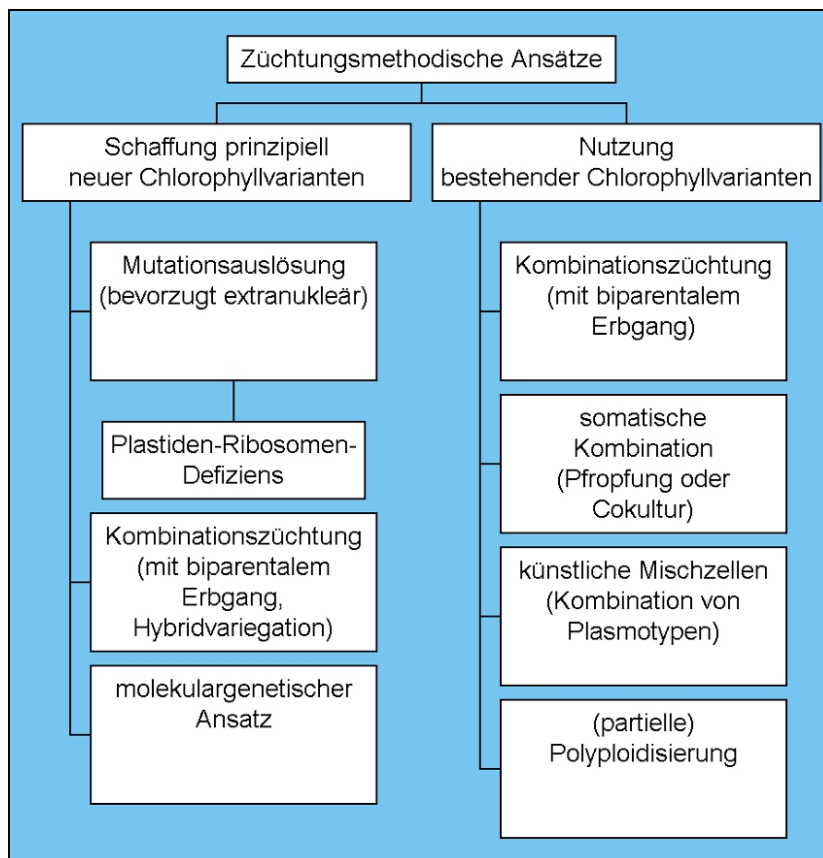


Abbildung 5 Methodische Ansätze zur Züchtung periklinalchimärischer Laubblattvarianten

1.4.1 Chlorophylldefektmutationen

Primär entstehen Periklinalchimären aus mutierten Einzelzellen, die im Verlauf der Sprossentwicklung genetisch veränderte Sektoren hervorbringen. Umfassen derartige Sektoren einzelne Schichten neu gebildeter Meristeme, so liegt eine in Achselknospen reproduzierbare Konfiguration vor (BERGANN 1967). **Mutationen mit Auswirkungen auf die Chlorophyllsynthese können periklinalchimärische Laubblattvarianten hervorrufen.** Dabei ist es zunächst einmal unerheblich, ob sich das Mutationsereignis im Zellkern (z.B. BAE et al. 2000, LEON et al. 1998) oder extrachromosomal, das heißt bevorzugt in den Plastiden, abspielt und auf welche Weise es zu Stande kommt. Mit der Fixierung auf die Plastiden als Ziel mutagener Behandlungen lassen sich jedoch eine ganze Reihe experimenteller Vorteile verbinden. Zum einen werden große Teile des Photosyntheseapparats im Plastom codiert; das überschaubare Plastidengenom höherer Pflanzen codiert ca. 50 % der am Aufbau des Assimilationsapparates beteiligten Proteinkomplexe (MAIER und SCHMITZ-LINNEWEBER 2004). Das heißt, die Wahrscheinlichkeit Chlorophylldefekte als Folge von Plastommutationen hervorzurufen ist gegenüber Veränderungen im Zellkern ungleich höher. Zum anderen lassen sich extrachromosomale Mutationen innerhalb der Gattung *Pelargonium* - sofern sie sich in der L2 manifestieren - kombinationszüchterisch weiterbearbeiten (siehe 1.4.2.). Darüber hinaus muss der tetraploide Zustand des zu behandelnden Ausgangsmaterials Berücksichtigung finden. Anders als im Plastom, wo Entmischungsprozesse bei jeder Zellteilung ablaufen, bleiben potenziell rezessive

Chlorophylldefektmutationen im Kern phänotypisch zunächst unauffällig.

In der Vergangenheit erlaubten zufällige Chlorophylldefektmutationen verschiedentlich die Auslese neuer Klone (siehe 1.1). Die mutagene Behandlung grünlaubiger, tetraploider Hochleistungssorten kann im Idealfall direkt neue Chlorophyllvarianten etablierter Genotypen hervorbringen.

1.4.1.1 Einsatz von NMH

Aus der Gruppe der N-Nitroso-Verbindungen wird dem NMH (n-Nitroso-n-Methyl-Harnstoff) eine mutagene Wirkung insbesondere auf das pflanzliche Plastom zugeschrieben (HAGEMANN 1982, 1992). **Der Einsatz von NMH bietet die Möglichkeit Chlorophylldefektmutationen vergleichsweise zielgerichtet auszulösen.** Die alkylierende Verbindung verursacht Methylierungen insbesondere an den Nucleotiden Guanin und Adenin, in deren Anschluss Basenfehlpaarungen (Transitionen) im Verlauf der DNA-Reduplikation zu punktuellen Mutationen führen. Reparaturprozesse, beispielsweise das Herausschneiden alkylierter Nucleotide, können neben der primären Basenfehlpaarung sekundäre, indirekte Mutationen hervorrufen (FRIEDBERG 1985). Tabelle 4 liefert einen Überblick zu publizierten NMH-Mutationsversuchen an höheren Pflanzen.

Tabelle 4 Publierte NMH-Mutationsversuche (Überblick)

Objekt	Behandlungsart	Quelle
<i>Arabidopsis</i>	Samen	MÜLLER 1964
<i>Helianthus</i>	Samen	USATOV et al. 2005, TRIBOUSH et al. 1999, BELEZKII et al. 1969
<i>Saintpaulia</i>	Blattstecklinge	POHLHEIM 1981a, POHLHEIM und BEGER 1974, HENTRICH und BEGER 1974
<i>Antirrhinum</i> , <i>Pelargonium</i>	Samen, Sprosse	HAGEMANN 1976
<i>Solanum</i>	Sprossknollen	POHLHEIM 1981b
<i>Lycopersicum</i>	Samen	HOSTICKA und HANSON 1984
<i>Nicotiana</i>	Samen	MARCOTRIGIANO und HACKETT 2000, DAVIDSON et al. 1987, FLUHR und CSÉPLO 1986
<i>Capsicum</i>	Samen	RAJAM 1988
<i>Lycopersicum</i> , <i>Catharanthus</i>	Samen	KIEŁCZEWSKI 1989
<i>Weigelia</i>	Samen	BENGUS 1999

Die Entstehung periklinalchimärischer Chlorophylldefektmutanten nach NMH-Behandlung wird von MARCOTRIGIANO und HACKETT (2000), BENGUS (1999), KIEŁCZEWSKI (1989), POHLHEIM (1981a+b) sowie HENTRICH und BEGER (1974) dokumentiert, wobei BENGUS wohl

als bislang einziger Autor einen konkreten, praktischen Züchtungsansatz im Zierpflanzenbau verfolgte. Erfolgreiche Behandlungen von *Pelargonium x zonale*-Stecklingen werden von HAGEMANN (1976) nur beiläufig erwähnt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten wurden Mutationsexperimente der Firma pac® Elsner Jungpflanzen, Dresden, konzeptionell begleitet. Hinsichtlich verwertbarer Chlorophylldefekte vorselektiertes Material aus NMH-Samenbehandlungen nach HAGEMANN (1982) sollte bonitiert und nach Möglichkeit genetisch/histologisch charakterisiert werden.

1.4.1.2 Plastiden-Ribosomen-Defizienz

Die Bildung von Sprossen mit stabil albinotischen Eigenschaften über sehr gezielte Eingriffe in den Genexpressionsapparat von Plastiden wird von einigen Autoren beschrieben. **Die experimentelle Schaffung Plastiden-Ribosomen-defizienter *Pelargonium*-Formen bietet möglicherweise die Chance definierte Plasmavarianten zu erzeugen.** Der elegante und methodisch einfache Ansatz basiert auf der Blockade des plastideneigenen Translations- bzw. Transkriptionsapparates über den Einsatz ausgewählter Antibiotika (ZUBKO und DAY 1998). Aus der Humanmedizin bekannte Wirkstoffe können die plastideneigene Proteinbiosynthese unterbinden, wobei der kerncodierte Teilungsmechanismus der Plastiden unbeeinflusst erhalten bleibt. Unter der Annahme, dass im Chloroplast die Synthese neuer plastidärer Ribosomen ebenfalls unterbunden wird, entstehen ribosomenfreie Zelldeszendenzen, die auch nach dem Abbau der antibiotischen Hemmstoffe keinen funktionsfähigen Translationsapparat aufweisen. Vergleichbar mit Plastidmutanten ist die kombinationszüchterische Weiterverarbeitung stabil albinotischer Sprosse denkbar. Von den ribosomenfreien Getreidemutanten „albostrians“ (*Hordeum*) und „iojap“ (*Zea*) generierten ZUBKO und DAY (2002) stabile Phänokopien. PYKE et al. (2000) konnten nach Samen- und Knospenbehandlungen Albino- sowie „Yellow-green“-Typen von *Brassica napus* etablieren. „Yellow-green“-Varianten konnten als chimärisch (Typ GWW) identifiziert werden.

Die vorliegende Studie fasst Knospenbehandlungen innerhalb eines Sortiments tetraploider *Pelargonium x zonale*-Hybriden über drei Jahre zusammen. In gestaffelten Konzentrationen und Kombinationen kamen die antibiotischen Wirkstoffe Spectinomycin, Streptomycin sowie Rifampicin zur Verwendung. Mit der Sorte 'Mrs Parker' existiert auf diploider Ebene bereits eine Chlorophylldefektvariante mit hochgradiger Ribosomendefizienz (STEINER et al. 1988, BÖRNER et al. 1973). Es galt zu prüfen, inwiefern die experimentelle Synthese analoger Formen auf tetraploider Ebene gelingt.

1.4.2 Kombinationszüchtung

Die kombinationszüchterische Bearbeitung chimärischen Materials zieht in jedem Fall die Auflösung des Gewebeverbandes im zygotischen Ein-Zell-Stadium nach sich. Karyogenetisch ergeben Kreuzungen mit chimärischen *Pelargonium*-Formen jeweils homohistische Hybriden aus den Genotypen der zweiten apikalen Schicht, die in der Regel die sporogenen Gewebe hervorbringt (STEWART et al. 1974). Kreuzungen mit Pflanzen, deren Laubblattvariegationen auf chimärische Muster zurückzuführen sind, lassen sich deshalb nur erfolgreich durchführen, wenn es

in der F1 zur somatischen Entmischung von Erbanlagen kommt, die in der Zygote nur vorübergehend „vereinigt“ sind. Innerhalb der Gattung *Pelargonium* kommt daher den extranukleären Erbträgern und deren biparentaler Vererbung eine entscheidende Bedeutung zu.

Innerhalb des Spektrums weißbunter *Pelargonium x zonale*-Hybriden konnten für eine ganze Reihe von Sorten Chlorophylldefekte als plastidenautonom nachgewiesen werden (Tab 3). Das heißt, in der F1 können nach Kombination grüner und weißer Plasmavarianten und anschließender Entmischung periklinalchimärische Laubblattmuster entstehen. **Die kombinationszüchterische Bearbeitung von *Pelargonium*-Weißrandvarianten ist möglich, wenn Chlorophylldefekte extranukleär vererbt werden.**

Die sexuelle Kombination von *Pelargonium*-Formen ist jedoch nur dann Erfolg versprechend, wenn beide Eltern vergleichbare Chromosomenzahlen aufweisen. Kreuzungen mit dem modernen tetraploiden Sortiment sind also ausschließlich auf tetraploider Stufe denkbar (siehe 1.5).

Im Rahmen der Studie musste zunächst die periklinalchimärische Konstitution ausgewählter diploider Sorten belegt werden. Reziproke Kreuzungen sollten anschließend die extranukleäre Natur von *Pelargonium*-Weißrandvarianten nachweisen. Die Nachuntersuchung von Sorten mit bereits beschriebenem Variegationstyp (Tab. 3) diente zum einen der Verifikation von Versuchsergebnissen, zum anderen sind aktuelle Bezeichnungen für alte Klone nicht immer verlässlich. Für chimärische diploide Weißrandpelargonien mit plastomdefekter L2 sollte anschließend ein effektives Polyploidisierungsverfahren entwickelt werden. Die Charakterisierung tetraploider L2-Varianten hinsichtlich praxistauglicher Selektionsmerkmale stellte ein Zwischenziel dar. Reziproke Kreuzungen auf tetraploider Stufe mussten die prinzipielle Kombinierbarkeit der alten Genotypen mit den modernen Hochleistungssorten nachweisen. Die Frage, wie und ob sich die bis zu 150 Jahre alten Plasmotypen nach biparentalen Erbgängen im Segregationsprozess behaupten können, bedurfte der Klärung. Abschließend sollten erste tetraploide Weißrandvarianten in ihren Musterproportionen analysiert und auf ihre gartenbauliche Eignung geprüft werden (Abb. 6).

Die ausgeprägte interspezifische Kreuzbarkeit innerhalb der Gattung *Pelargonium* erlaubt es prinzipiell auch farbdefekte Plasmavarianten aus verwandten Formen in *P. x zonale* einzuführen. CLIFFORD (1970) listet variegated *Pelargonium*-Klone auf, darunter *P. x peltatum*-Kultivare. Letztere können prinzipiell mit der *P. x zonale*-Gruppe kombiniert werden (COFFIN und HARNEY 1978). Existierende tetraploide, variegated *P. x peltatum*-Formen (pac® Elsner Jungpflanzen, persönliche Kommunikation) fanden im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch keine Berücksichtigung.

Unter Ausnutzung biparentaler extranukleärer Erbgänge können darüber hinaus auch völlig neue Chlorophylldefekte generiert werden. Insbesondere nach interspezifischen Kreuzungen können Wechselwirkungen des Hybrid-Zellkerns mit den genetisch grünen Plastiden der Elternpflanzen Ausbleichungen hervorrufen. Reagiert nur ein Plastidentyp auf das Hybridkerngenom mit einem Chlorophylldefekt, so können farbmarkierte Deszendenzmuster auftreten (POHLHEIM 1986, METZLAFF et al. 1982, KIRK und TILNEY-BASSETT 1978, RENNER 1936a). **Kreuzungen mit biparentalem Erbgang können prinzipiell neue, chimärische Chlorophyllvarianten hervorbringen, die sich auf die genetisch/physiologische Semieautonomie der Chloroplasten zurückführen lassen.**

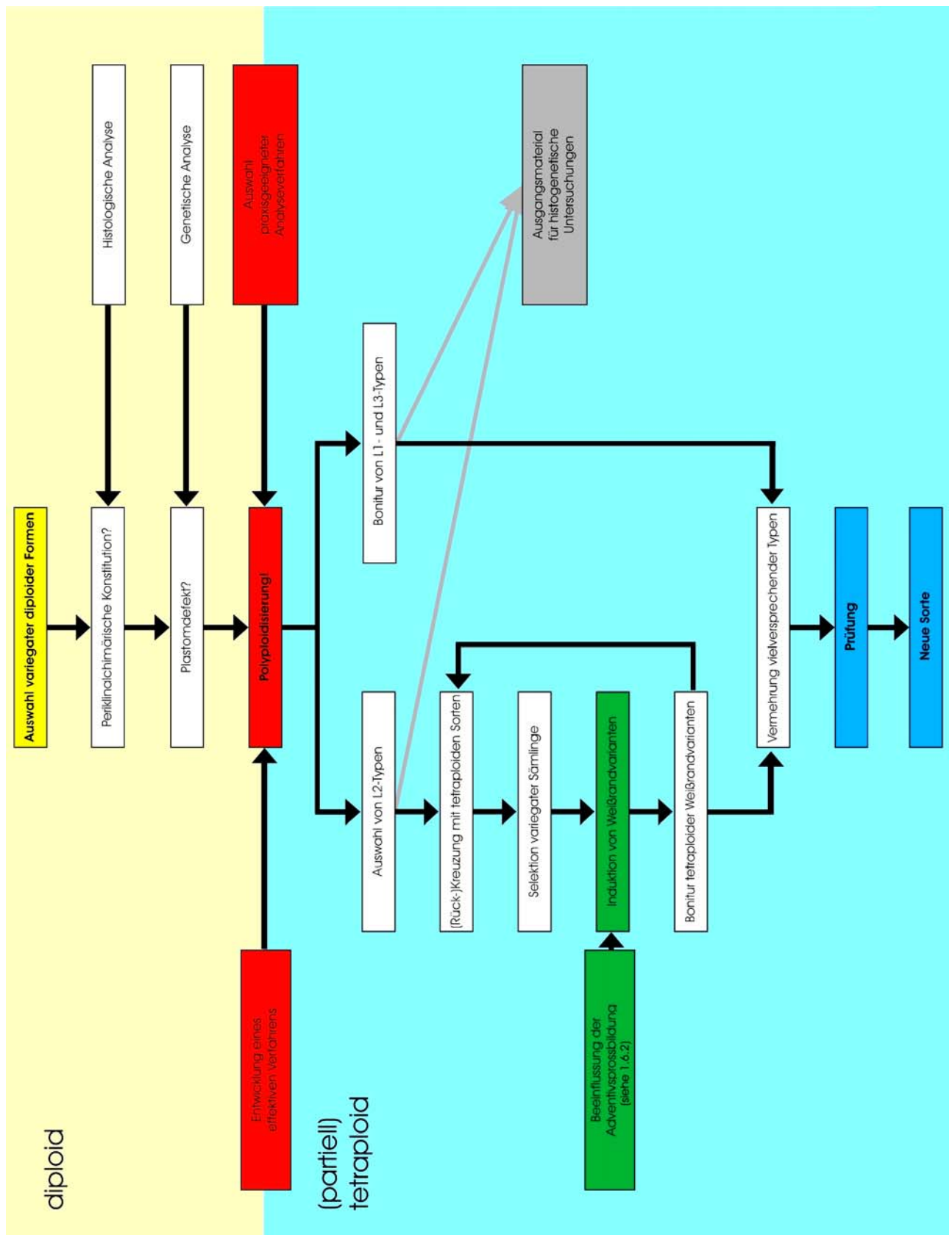


Abbildung 6 Züchtung von *Pelargonium*-Laubblattvarianten mit tetraploiden Gewebekomponenten, kombinationszüchterischer Ansatz

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Kreuzungen aktueller Hochleistungssorten mit einer tetraploiden Variante der botanischen Art *Pelargonium zonale* durchgeführt, die aus Voruntersuchungen von Prof. POHLHEIM an der Humboldt-Universität zu Berlin hervorgegangen war (POHLHEIM unveröffentlicht). Im Hinblick auf die Generierung hybridvariegater, prinzipiell neuer Laubblattmusterungen war zu klären, ob sich das moderne Sortiment überhaupt mit dem polyploidisierten Stammelter kreuzen lässt, ob Chlorophylldefekte auftreten und inwieweit diese ein Segregationsmuster erkennen lassen, das auf einen biparentalen Erbgang schließen lässt. Entstehende Kern-Rand-Musterungen sollten auf ihre Proportionen und gärtnerische Verwertbarkeit geprüft werden.

In diesen Arbeitsbereich fielen gleichfalls Kreuzungen, die mit hybridvariegatem Material nicht exakt definierter Herkunft (siehe Material) auf tetraploidem Niveau durchgeführt wurden. Die Stabilität des Farbdefekts in Rückkreuzungen, seine extranukleäre Natur sowie der züchterische Wert entstehender Nachkommenschaften war zu testen.

1.4.3 Regeneration künstlicher Mischzellen

Die Neukombination plasmatischer Erbträger in einer Zelle ist biotechnologisch möglich (CROSSWAY et al. 1986). Über Plastidentransplantationen bzw. asymmetrische Zellfusionen lassen sich somatische Mischzellen erzeugen, aus denen bei Regeneration chimärische Sprosse hervorgehen können (LIU et al. 2005, RÁKOSY-TICAN et al. 2001, EIGEL und KOOP 1992, KOOP et al. 1992, MALONE et al. 1992, EIGEL et al. 1991, GALUN und AVIV 1986). **In vitro-Kulturverfahren erlauben die Schaffung künstlicher Mischzellen.** Dienen tetraploide Zellen moderner Sorten als Rezipienten für genetisch weiße Donator-Plastiden, so ist der karyologische Zustand der Spenderzellen nebensächlich. Die Regeneration asymmetrischer Kern-Plasma-Konstrukte, sogenannter Cybriden, setzt die Etablierung eines Protoplastenkulturverfahrens voraus. Einen Teilaspekt der vorliegenden Studie bildeten Arbeiten zur Schaffung von Zellsuspensionen als Ausgangsmaterial für erste enzymatische Verdauungen. (siehe 1.6).

Interspezifische Kern-Plasma-Kombinationen (z.B. *Nicotiana/Atropa* SCHMITZ-LINNEWEBER et al. 2005, HERRMANN et al. 2003; *Cichorium/Helianthus* VAROTTO et al. 2001) zeigen die Plastizität intrazellulärer Kommunikation. Das nicht seltene Auftreten von Chlorophylldefekten bei Cybriden liefert, vergleichbar dem Phänomen der Hybridvariegation, einen weiteren Ansatzpunkt im Hinblick auf die Etablierung prinzipiell neuer, variegater Formen.

1.4.4 Somatische Kombination

Die experimentelle Synthese von Chimären aus definiertem Ausgangsmaterial gelingt, wenn teilungsaktive Zellen ausgewählter Partner zur Bildung zusammengesetzter Meristeme angeregt werden können. *In situ* können nach klassischen, baumschulüblichen Veredlungsverfahren chimärische Adventivsprosse aus Verwachsungsstellen gewonnen werden (POHLHEIM 1992, Überblick: TILNEY-BASSETT 1986). Die Verlagerung dieses Verfahrens in die Sterilkultur gelang bei *Brassica* (NOGUCHI et al. 1992). Die Kokultur isolierter Zellen *in vitro* und die Regeneration von Heterohistonten aus Mischgeweben wurde vereinzelt erfolgreich praktiziert (LINDSAY et al. 1995, BINDING et al. 1987, MARCOTRIGIANO und GOUIN 1984, CARLSON und

CHALEFF 1974). **Chimärische Sprosse können über die somatische Kombination ausgewählten Ausgangsmaterials erzeugt werden.** Dabei enden die Möglichkeiten der asexuellen Kombination nicht an den Artgrenzen. Selbst gattungsübergreifende Gewebekombinationen ließen sich in der Vergangenheit realisieren (*Laburnum* + *Cytisus*, *Lycopersicum* + *Solanum*, *Crataegus* + *Mespilus*, Überblick: TILNEY-BASSETT 1986).

Die experimentelle Synthese von Periklinalchimären über Sprossregenerationen aus Mischgeweben sollte im Rahmen dieser Untersuchung über eine *in vitro*-Veredlungstechnik erreicht werden. Homohistisch weiße, aus den laufenden Kreuzungen hervorgegangene Sämlinge sollten auf grüne tetraploide Unterlagen gepfropft und zur Verwachsung gebracht werden.

1.4.5 Molekulargenetischer Ansatz

Mangelnde Verbraucherakzeptanz wie auch eine unübersichtliche rechtliche Basis machen molekulargenetische Eingriffe im Zierpflanzensektor auf absehbare Zeit zu vorwiegend wissenschaftlichen Unterfangen. Erste Studien zur Schaffung transgener Pelargonien liegen jedoch vor (WINKELMANN et al. 2005, KRISHNARAJ et al. 1997, ROBICHON et al. 1995). Die von BOCK und HAGEMANN (2000) zusammengefassten Vorteile transplastomer Pflanzen (Expressionslevel, einfache genetische Struktur im Plastom etc.) machen intensive wissenschaftliche Bemühungen auf der Suche nach extranukleären Transformationssystemen, wie sie für Tabak und Arabidopsis bereits existieren, in den nächsten Jahren wahrscheinlich. Das vergleichsweise simple „Ausschalten“ einzelner photosyntheserelevanter Gene im überschaubaren und gattungsübergreifend weitgehend konservierten Plastom dürfte dann kein prinzipielles experimentelles Hindernis mehr darstellen.

1.5 Züchtung auf tetraploidem Niveau

Tabelle 5 verdeutlicht, dass für den überwiegenden Teil der methodischen Ansätze (1.4) Ausgangsmaterial direkt aus den bestehenden Sortimenten entnommen werden kann. Kreuzungen mit existierenden Plasmavarianten sind jedoch erst im Anschluss an die Polyploidisierung diploider Weißrandformen erfolgversprechend.

Innerhalb der Sektion *Ciconium* wird von einer Chromosomengrundzahl von $x=9$ ausgegangen (GIBBY et al. 1990). Neben einer haploiden *P. x zonale*-Variante (DAKER 1966) konnten aneuploide Formen nachgewiesen werden (PHILIPPI 1961, DAKER 1969). BADR und HORN (1971a) zählten für 23 diploide Sorten $2n=2x=18$ und für 60 tetraploide Sorten $2n=4x=36$ Chromosomen. Von wenigen Sonderformen abgesehen werden moderne, stecklingsvermehrte *P. x zonale*-Sortimente von tetraploiden Klonen dominiert (pac® Elsner Jungpflanzen, persönliche Kommunikation). Für *Pelargonium x zonale*-Hybriden ist die erfolgreiche sexuelle Kombination diploider und tetraploider Formen nur in wenigen Fällen belegt (CRAMER und CRAIG 1991, BADR 1971). Die entstandenen diploiden oder tetraploiden Hybriden werden von CRAMER und CRAIG auf teilweise unreduzierte Gameten zurückgeführt, die ein selektierter Versuchsklon hervorbringt. BADR macht apomiktische Prozesse für die Entstehung von Saatgut aus Valenzkreuzungen verantwortlich. Vitale triploide Bastarde aus Kreuzungen (diploid x tetraploid) sind dagegen niemals beschrieben worden (HORN 1994, BADR 1971, BADR und HORN 1971a+b, PHILIPPI 1961).

Tabelle 5 Überblick: Züchtung periklinalchimärischer *Pelargonium*-Formen mit tetraploiden Gewebekomponenten

Methode	Ausgangsmaterial			Konstitution der Zielpflanze	
	cytologisch	Farbtyp	histologisch	cytologisch	Farbtyp der L2
NMH-Applikation	tetraploid	grün	homohistisch	tetraploid, karyogenetisch unverändert	Plasmavariante wahrscheinlich
Plastiden-Ribosomen-Defizienz	tetraploid	grün	homohistisch	tetraploid, karyogenetisch unverändert	Plastiden-Ribosomen-defizient
Kreuzung (auch interspezifisch)	tetraploide L2	Plasmavariante notwendig	chimärisch	tetraploid, Hybrid	Plasmavariante
Kreuzung (Hybridvariegation)	tetraploid, weiter verwandt	grün	homohistisch	tetraploid, Hybrid	physiologischer Effekt
(partielle) Polyploidisierung	diploid	Kern- und Plasma-varianten möglich, letztere in Kreuzungen sinnvoll	chimärisch	(auto-)tetraploid, oder Cytochimären mit tetraploider Komponente,	Kern- und Plasmavarianten möglich
Protoplastenfusion/ Plastidentransplantation	nur Akzeptorzellen tetraploid	Plasmavariante notwendig als Donator	homohistisches Ausgangsmaterial sinnvoll	tetraploid, karyogenetisch unverändert	Plasmavariante
Pfropfung, somatische Kombination	mindestens ein Partner mit tetraploider Gewebekomponente	Kern- und Plasmavarianten möglich	auch chimärisches Ausgangsmaterial möglich	tetraploid, oder Cytochimären mit tetraploider Komponente, genetisch unverändert	Kern- und Plasmavarianten möglich
molekulargenetischer Ansatz	tetraploid	grün	homohistisch	tetraploid	Kern- und Plasmavarianten möglich

Für den kombinationszüchterischen Ansatz ist die Polyploidisierung der chlorophylldefekten L2 bestehender diploider Plastomvarianten zwingend, als sporogene Schicht bringt sie die Gameten hervor. Valenzerhöhungen nach mutagener Behandlung im somatischen Bereich können sich jedoch in allen Sprossscheitelschichten unabhängig voneinander manifestieren (TILNEY-BASSETT 1986, DERMEN 1967, SATINA et al. 1940). Vollständig tetraploide Formen (TTT/xWG) bzw. partiell tetraploide Varianten (z.B. DDT/xWG) besitzen möglicherweise einen züchterischen Wert, ohne dass mit ihnen auf tetraploider Ebene gekreuzt werden kann/muss. **Die Selektion (partiell) polyploidisierter Chlorophyllvarianten mit tetraploiden Gewebekomponenten erweitert die Möglichkeiten der züchterischen Bearbeitung periklinalchimärischer Zierpflanzen.**

RAO und SUPRASANNA (1996) fassen Methoden zur experimentellen Chromosomensatzverdopplung zusammen. Einige der beschriebenen Verfahren sind auch innerhalb der Gattung *Pelargonium* dokumentiert (Tab. 6).

Tabelle 6 Publierte Polyploidisierungsverfahren innerhalb der Gattung *Pelargonium*

Methode	Quelle
Knospenbehandlung (Kolchizin)	PLASCHIL et al. 2003, DAKER 1967, HAVAS 1942
Inokulation mit <i>B. tumefaciens</i>	HAVAS 1942
somaklonale Variation	SKIRVIN und JANICK 1976a+b, BENNICI 1974
Samenbehandlung (Kolchizin)	SCHMIDT 1976
Nutzung unreduzierter Gameten	CRAMER und CRAIG 1991

Es darf als sicher gelten, dass für die wirtschaftlich wichtigen *Pelargonium x zonale*-Hybriden in der züchterischen Praxis Polyploidisierungsverfahren etabliert wurden, die jedoch nicht in publizierter Form vorliegen. Den im Gartenbau verbreiteten kolchizinbasierten Applikationsvarianten gesellen sich in den letzten Jahren eine Reihe von Verfahren hinzu, die auf chemischen Mitoseinhibitoren wie Amiprofos-Methyl, Oryzalin, Trifluralin u.a. basieren (THAO et al. 2003, EECKHAUT et al. 2002, HANSEN und ANDERSEN 1996). Die vorliegende Untersuchung sollte eine effektive Polyploidisierungstechnik etablieren und auf ihre Praxiseignung hin prüfen. Im Rahmen der Arbeit mit chimärischem Ausgangsmaterial reduzieren sich die möglichen Applikationsformen auf Verfahren, in denen die stabilen Sprossscheitelkonstitutionen der vegetativ vermehrten Versuchspflanzen erhalten bleiben. Nach (partieller) Polyploidisierung vorliegende, doppelt markierte Versuchspflanzen sollten im Rahmen der Studie phänotypisch sowie histologisch charakterisiert werden. Insbesondere war zu prüfen, ob cytochimärische Weißrandvarianten mit ihren Musterproportionen möglicherweise Ansatzpunkte für ein effektives und einfaches Selektionsverfahren liefern.

1.6 *In vitro*-Kulturverfahren, Regenerationssysteme

Ein erschöpfender Literaturüberblick, wie ihn SCHLEGEL (1982) zu Verfahren der *in vitro*-Kultur für *Pelargonium* liefern konnte, ist heute ungleich schwieriger zu realisieren. Die Zahl der Publikationen dürfte sich seit Anfang der 80er Jahre von bis dahin ca. 50 auf weit über 100 wenigstens verdoppelt haben. Zu den grundlegenden Arbeitsgebieten Spross/Kalluskultur, Sprossregeneration, Mutationsauslösung und Pathogeneliminierung gesellen sich heute zunehmend Arbeiten zu Protoplastentechnik (siehe 1.6.1), somatischer Embryogenese (HAENSCH 2004a+b, MURTHY et al. 1996), genetischer Transformation (WINKELMANN et al. 2005, KRISHNARAJ et al. 1997, ROBICHON et al. 1995), Kryokonservierung (DUMET et al. 2002) und Embryo-Rescue (DENIS-PEIXOTO et al. 1997). Basis vieler dieser abgeleiteten Techniken bilden Regenerationssysteme, deren Etablierung für *Pelargonium x zonale* zwei wesentliche Probleme aufwirft. Die eingeschränkte Regenerationsfähigkeit differenzierter adulter *Pelargonium*-Explantate wird von vielen Autoren thematisiert. Für die in Europa nahezu ausschließlich vegetativ vermehrten *Pelargonium x zonale*-Hybriden kommen überwiegend Arbeitstechniken in Frage, in denen adultes Material geprüfter Sorten verarbeitet werden kann. Mit der Einführung von TDZ in die *Pelargonium-in vitro*-Kultur (VISSER et al. 1992) zeichnen sich hier Fortschritte ab. Die ausgeprägte Sortenspezifität aller Regenerationssysteme bleibt jedoch ein bis heute weitgehend ungelöstes Problem. Einen Überblick zu in den letzten Jahren entwickelten Regenerationssystemen für *P. x zonale* liefern MITHILA et al. (2001) (Tab. 7).

Tabelle 7 *Pelargonium x zonale* Sprossregenerationssysteme, (Protoplastentechniken: Tab. 8)

Ausgangsmaterial	Quelle	Ausgangsmaterial	Quelle
Blatt, Blattstiel	WINKELMANN et al. 2005	Kotyledonen, Hypokotyl, Wurzeln	CHANG et al. 1996
Leaf discs	HASSANEIN und DORION 2005	Segmente von Sämlingen	QURESHI und SAXENA 1992
Blattstiel, Hypokotyl	HAENSCH 2004a+b	Hypokotyl	MADDEN et al. 2005, VISSER et al. 1992
Wurzeln (<i>in vitro</i> – Sämlinge)	DOYLE et al. 2000	Suspension	ROBICHON et al. 1997 SCHLEGEL 1982 BENNICI 1974
Kotyledonen	MURTHY et al. 1996	Petalen	BENNICI 1974

1.6.1 Protoplastenkultur, Zellsuspensionen

Heute für zahlreiche Taxa etablierte Protoplastenkulturverfahren erweitern die Möglichkeiten der asexuellen Kombination von Genotypen über Zellfusionstechniken. Asymmetrische Konstrukte aus Zellkernen, Plastiden und Mitochondrien erlauben es darüber hinaus physiologisch/genetische Wechselwirkungen definierter Kern-Plasma-Gefüge zu untersuchen (DAVEY et al. 2005, LIU et al. 2005). Für die Gattung *Pelargonium* liegen Publikationen zu Protoplastenkulturverfahren vor (Tab. 8). Die bislang einzige erfolgreiche interspezifische somatische Hybridisierung gelang NASSOUR und DORION (2003). Die beiden Autoren beschreiben Fusionsprodukte aus *P. x hortorum* (2x) und *P. x domesticum* (4x).

Tabelle 8 Protoplastenkulturverfahren innerhalb der Gattung *Pelargonium*

Ausgangsmaterial	Arten/Sorten	Regenerat	Quelle
Laubblätter, Zellsuspensionen	<i>P. spec.</i> 'Concolor Lace', <i>P. x zonale</i> 'Antik' (2x), 'Perlenkette' (4x)	Sprosse nur aus Mesophyllproto- plasten	SCHUMANN 2005
Laubblätter	<i>P. x zonale</i> 'Panaché Sud' (2x), <i>P. x domesticum</i> 'Autum Haze' (4x)	Sprosse aus Fusionen	NASSOUR und DORION 2003, NASSOUR et al. 2001
Laubblätter	<i>P. x zonale</i> 'Alain' (2x)	Sprosse	NASSOUR et al. 2003, NASSOUR und DORION 2002
Kotyledonen, Laubblätter, Kallus	<i>P. zonale</i> , <i>P. aridum</i>	Kallus aus Fusionen	YU 1995
Zellsuspensionen	<i>P. x zonale</i>	Kallus nach Transformation	ZANG-KUAL et al. 1993
Kallus	<i>P. x domesticum</i>	Sprosse	DUNBAR und STEPHENS 1991
Zellsuspensionen	<i>P. aridum</i> , <i>P. zonale</i> , <i>P. x peltatum</i>	Sprosse	YARROW et al. 1987
haploide Zellsuspensionen aus Antherenkultur	<i>P. x zonale</i>	Zellkolonien	ABO EI-NIL und HILDEBRANDT 1976
Laubblätter	<i>P. x zonale</i>	Sprosse	KAMEYA 1975

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden im Hinblick auf die Etablierung eines effektiven Verfahrens zur Schaffung künstlicher Mischzellen Voruntersuchungen durchgeführt. Auf der Basis charakterisierter Zellsuspensionskulturen sollte zunächst ein reproduzierbares Protoplasten-regenerationssystem entwickelt werden.

Nach SCHUMANN (2005) ist der Aufbau von Suspensionskulturen „ein aufwändiger, langwieriger Prozess“. Erfolgreich etabliert liefert das Kultursystem jedoch zuverlässig teilungsaktives Ausgangsmaterial in exakt definierbaren Entwicklungsstadien (SCHUM et al. 2001). In Anlehnung

an für die Gattung *Pelargonium* näher beschriebene Suspensionskulturverfahren (ROBICHON et al. 1997, SCHLEGEL 1982, BENNICI 1974) sollten sterile Explantate aktueller tetraploiden Sorten in Flüssigkulturen überführt werden. Nach Analyse des Wachstumsverlaufs der Zellklone sollte eine Basis für reproduzierbare enzymatische Verdauungen gegeben sein.

1.6.2 Multiple Adventivsprossinduktion

Die somatische Segregation heteroplastidischer Zygoten nach biparentalen Erbgängen ist ein Prozess, der sich im Gegensatz zu histogenetischen Entmischungen chimärischen Materials (BERGANN und BERGANN 1959) experimentell in der Regel nicht beeinflussen lässt (TILNEY-BASSETT 1970). Die Gewinnung von Weißrandformen (xWG-Varianten) aus variegaten Sämlingen ist jedoch für die Beurteilung potenzieller neuer Sorten zwingend (die züchterische Weiterarbeit ist auch mit xWx-Sprossen möglich). Nach Entmischung der elterlichen Plastiden bilden sich in der F1 homogene Zelldeszendenzen aus, die in Abhängigkeit von der Entwicklung des mehrschichtigen Sprossscheitels sektorial, periklinal oder meriklinal angeordnet sein können (Abb. 4). Dabei werden weiße Zellklone auch aus teilungsaktiven Bereichen verdrängt. Die mikroskopische Bonitur unreifer variegater Sämlinge lieferte Belege für sehr frühzeitige, nicht stochastische Entmischungen nach biparentalen Erbgängen. Nicht selten bleibt eine Plasmavariante auf den Suspensor bzw. den basalen Bereich des Embryos beschränkt (TILNEY-BASSETT in HAGEMANN 2000). Bereits ERWIN BAUR (1909) weist auf das Vorliegen makroskopisch unsichtbarer, farbmarkierter Zellareale in vermeintlich einfarbigen Sämlingen aus biparentalen Kreuzungen hin.

Ziel der Versuche zur Adventivsprossinduktion *in vitro* war die Regeneration möglichst zahlreicher Sprosse mit gemischten Gewebekomponenten bzw. die Gewinnung weißer Triebe in Kombination mit grünen Ammensprossen aus variegaten Sämlingen. Rein weiße Seitensprosse können zur Blüte gebracht werden und in weiteren Kreuzungen Verwendung finden.

Parallel zu den *in vitro*-Applikationen wurden in Anlehnung an MURCH et al. (1997) sowie SANAGO et al. (1995) TDZ-Gießversuche im Gewächshaus durchgeführt. TDZ-induzierte basale Sprossregenerate sollten auch hier den züchterisch verwertbaren variegaten bzw. weißen Output erhöhen.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Das verwendete Pflanzenmaterial wurde überwiegend von pac® Elsner Jungpflanzen, Dresden zur Verfügung gestellt und entstammt auf tetraploider Ebene weitgehend den 2001-2004 aktuellen Sortimenten des Betriebes (Tab. 10). Die diploiden weißbunten Sorten 'Mrs Pollock', 'Contrast', 'Crystal Palace Gem' und 'Frank Headley' sowie die tetraploide 'pac® Melosilver' sind im Sortiment 2001/2002 verzeichnet (pac® Elsner Jungpflanzen 2001). Die darüber hinaus in Abbildung 9 und Tabelle 9 aufgeführten Weißrandvarianten entstammen der Genbank-Sammlung des Betriebes. Diploide und tetraploide Klone wurden auch auf sterilen Nährmedien aus Dresden bezogen. Kreuzungen diploider Weißrandvarianten wurden mit homohistisch grünen Testeltern durchgeführt, die an der Humboldt-Universität zu Berlin aus dem variegaten Sortiment gewonnen wurden. Sie gehen auf histogenetische Umlagerungsprozesse zurück und repräsentieren genetisch grüne Scheitelschichten der Ausgangspflanzen. Die in Versuchen zur Hybridvariegation auf tetraploider



Abbildung 7 Tetraploide Variante von *Pelargonium zonale*



Abbildung 8 Hybridvariegater Spross aus einem Kreuzungsprogramm unter Beteiligung von *P. articulatum* (4x)

Ebene eingesetzte Ploidievariante der botanischen Art *Pelargonium zonale* ist auf Mutationsexperimente an der Humboldt-Universität zurückzuführen (POHLHEIM unveröffentlicht) (Abb. 7). Im gleichen Arbeitspaket konnte auf tetraploide hybridvariegate *Pelargonium*-Kreuzungen zurückgegriffen werden, die in Dresden unter Verwendung von *Pelargonium articulatum* WILLD. (4x) erzeugt wurden (F3-F4, pac® Elsner, persönliche Kommunikation) (Abb. 8). Das in Dresden für NMH-Mutationsexperimente verwendete Saatgut (diploid und tetraploid) entstammte den aktuellen Kreuzungsprogrammen des Betriebes. Versuche zum Aufbau von Zellsuspensionskulturen gehen auf sterile Explantate der tetraploiden pac®-Sorten 'Viktoria' und 'Perlenkette Orange' zurück, die auf einem Regenerationsmedium aus Dresden nach Berlin kamen. Diploide und tetraploide Sämlinge als Ausgangsmaterial für die Versuche zur multiplen Adventivsprossinduktion

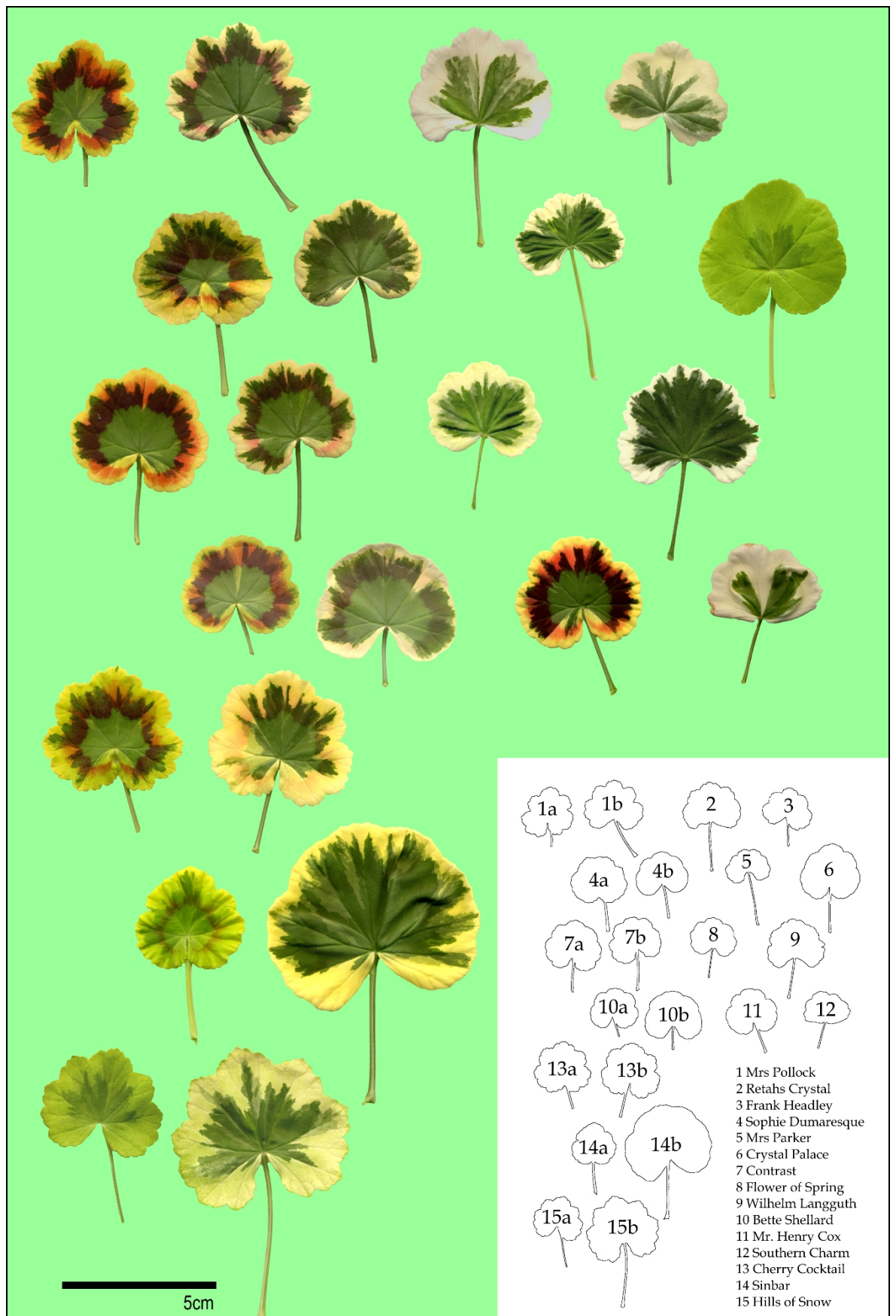


Abbildung 9 In Kreuzungen verwendete diploide Weißrandpelargonien, Sortenübersicht

entstammten eigenen Kreuzungsarbeiten.

Tabelle 9 Diploide *Pelargonium x zonale*-Weißrandvarianten und ihre Verwendung

Sorte	Verwendung	Sorte	Verwendung
'Bette Shellard'	K, P	'Mrs Parker'	K, P
'Cherry Cocktail'	K, P	'Mrs Pollock'	K, P
'Crystal Palace Gem'	K, S	'Retahs Crystal'	K, P
'Contrast'	K, P	'Sinbar'	K, P
'Flower of Spring'	K, P	'Sophie Dumaresque'	K, P
'Frank Headley'	K, P, S	'Southern Charm'	K
'Hills of Snow'	K, P	'Westdale Appleblossom'	P
'Mr Henry Cox'	K, P	'Wilhelm Langguth'	K, P

Kreuzung, Polyploidisierung, Selbstung

Tabelle 10 Tetraploide *Pelargonium x zonale*-Hybriden aus Sortimenten von pac® Elsner Jungpflanzen, Dresden und ihre Verwendung

pac®-Sorte*	Verwendung	pac®-Sorte*	Verwendung
'Bergpalais'	H, A, K	'Perlenkette Sabine'	K
'Juliane'	H, A, K	'Purpurball'	H, K
'Lauretta'	A, S, K	'Robe'	H, A, K, U
'Lorena'	H, A	'Samelia'	H, A
'Melo cherry'	H, K	'Shocking Pink'	H, A
'Melosilver'	K	'Viktoria'	Susp.
'Penve'	H, A	'Wendy'	H
'Perlenkette Orange'	K, Susp.		

Antibiotikabehandlung, Hybridvariegation, Kreuzung, Selbstung; **Suspension**; Unterlage

*) im Rahmen der Untersuchung werden als 'Sortennamen' die üblichen Handelsbezeichnungen verwendet

2.1.1 Kulturbedingungen

Die Kultur der Pflanzen erfolgte überwiegend in Kunststofftöpfen mit manuell gesteuerter Mattenbewässerung. Die genutzten Einheitserden (TKS) wurden regelmäßig mit flüssigen Mehrnährstoffdüngern versorgt. In den Wintermonaten (Oktober bis April) wurde in den Foliengewächshäusern eine Zusatzbeleuchtung mit Natriumdampflampen installiert. Das festgelegte Temperaturminimum betrug 20°C. Über den gesamten Bearbeitungszeitraum wurde der Pflanzenbestand nach Bedarf über Stecklinge verjüngt/vermehrt.

Aussaaten in Petrischalen auf Filterpapier ließen sich auch unter dem Einsatz von Fungiziden nicht frei von Auflaufkrankheiten realisieren. Die Verluste durch Infektionen waren teilweise erheblich. Tetraploides Saatgut sowie alle für sterile Weiterkultur vorgesehenen Chargen wurden deshalb *in vitro* steril ausgesät (2.2.6.1).

2.2 Methoden

2.2.1 Kreuzung

Kreuzungen fanden in den Jahren 2001-2004 jeweils von März bis Oktober statt. Die Kombinationen auf diploider Ebene sowie Paarungen zur Hybridvariegation wurden dabei bei vollständiger Kastration der Mutterpflanzen durchgeführt. Dazu wurden halb geöffnete Knospen aufpräpariert und noch nicht voll differenzierte Staubblätter entfernt. Bei den reziproken Kreuzungen mit polyploidisierten Weißrandvarianten wurde auf eine Kastration verzichtet um das beschränkte Pollenangebot maximal auszunutzen. Die ausgeprägte Protandrie der verwendeten *Pelargonium*-Sorten unterbindet unbeabsichtigte Selbstungen im Gewächshaus weitgehend. Das nur begrenzte Blütenangebot auf Seiten der erfolgreich polyploidisierten variegaten Sorten machte die Verwendung eines Pollenmixes verschiedener tetraploider Sorten sinnvoll. Im Hinblick auf den zeitlichen Rahmen der Studie sollten aus Sortenunverträglichkeiten resultierende Ausfälle minimiert werden. Bestäubt wurde 3-4 Mal wöchentlich jeweils vormittags. Dazu wurden reife Antheren der Pollenspender abgenommen und auf geöffneten Narbenästen der vorgesehenen Mutterpflanzen abgestreift.

2.2.2 Nachweis chimärisch bedingter Laubblattvariegationen

Belege für die stabile periklinalchimärische Koexistenz genetisch verschiedener Zellklone lassen sich auf verschiedenen experimentellen Ebenen erbringen (TILNEY-BASSETT 1986, 1963a, STEWART et al. 1974). Neben der Identifizierung von Idiotypen direkt in mehrschichtigen Sprossscheiteln bzw. in sich aus diesen ableitenden Organen mit typischer Gewebekomposition liefern spontane bzw. induzierte Entmischungen der Gewebepartner Hinweise auf chimärische Konstitutionen (BERGANN und BERGANN 1959, BATESON 1916). Im Rahmen der Untersuchung verwendete Nachweisverfahren für einzelne apikale Schichten bzw. deren Deszendenz fasst Tabelle 11 zusammen. Hinsichtlich des Merkmals „Chlorophylldefekt“ können herkömmlich nur abgeleitete Informationen erfasst werden, die auf die Zustände im Sprossscheitel indirekt schließen lassen. Die teilungsaktiven Zellen im apikalen Meristem sind farbphänotypisch nicht zu unterscheiden. Zur Untersuchung des Laubblattaufbaus wurden Handdünnschnitte sowie

Epidermisabzüge angefertigt. Darüber hinaus wurden Kunststoff-Dauerpräparate (Hydroxyethylmethacrylat) nach einem von der Firma Heraeus-Kulzer, D, entwickelten Verfahren angefertigt (PLASCHIL 1997, OLBRICHT 1998). Mikrotomdünnschnitte (Schnittstärke 5-8 µm) wurden mit Hämatoxylin nach DELAFIELD (ROMEIS und BÖCK 1989) gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

Tabelle 11 Nachweisverfahren für periklinalchimärische Laubblattvariegationen bei *Pelargonium* auf verschiedenen experimentellen Ebenen (Erläuterungen im Text)

		Merkmal Chlorophylldefekt		
		histo/morphologisch	genetisch	vegetativ
apikale Schicht/ Deszendenz	L1	Bildet die Epidermis, Chloroplasten jedoch nur in den Stomatazellen ausgebildet, mitunter Laubblattrandbeteiligung, häufig Beteiligung am Mesophyll der Stipeln		das wiederholte Auftreten von Sprossvarianten deutet auf histogenetische Umlagerungs- bzw. Entmischungsprozesse und damit auf chimärische Konstitutionen
	L2	Subepidermale i.d.R. L2-bürtig, regelmäßig Mesophyllbeteiligung am Aufbau des Blattrandes	Gameten in der Regel L2-bürtig, biparentale Vererbung von Plastomvarianten	
	L3	Mesophyll im Blattzentrum i.d.R. L3-bürtig		Adventivwurzelaustriebe repräsentieren i.d.R. die L3

2.2.3 Nachweis extranukleär codierter Chlorophylldefekte

Als Indiz für extranukleär codierte Merkmale wurde das Auftreten variegater Sämlinge nach Testkreuzungen erfasst. Segregationsmuster auf Kotyledonen und jüngsten Laubblättern von F1-Pflanzen aus Kreuzungen weißer und grüner L2-Plasmavarianten wurden als Beleg für biparentale Erbgänge gewertet. Reziproke Paarungen (g x w und w x g) wurden auf „nicht-mendelnde“ Spaltungsverhältnisse überprüft (HAGEMANN 1982, KIRK und TILNEY-BASSETT 1978).

2.2.4 Polyploidisierungsversuche

2.2.4.1 Mutagenbehandlung

Die Versuche zur Polyploidisierung von Laubblattvarianten des diploiden Sortiments wurden in den Jahren 2001 bis 2004 im Gewächshaus durchgeführt. Zur Anwendung kamen die Mitoseinhibitoren Kolchizin, Trifluralin sowie Amiprofos-Methyl. Für Mutationsexperimente vorgesehene Pflanzen wurden im Vorfeld stark zurückgeschnitten und anschließend zwei bis vier wüchsige Sprosse je Pflanze herangezogen. Die Knospenbehandlungen wurden jeweils in den Morgenstunden vorgenommen. Zwischen zwei und acht Apikal- bzw. gut ausgebildete Lateralknospen einer Versuchspflanze wurden markiert und mit Wirkstofflösungen unterschiedlicher Konzentration behandelt. Kolchizinapplikationen erfolgten über etwa erbsengroße Wattebäusche, die über einen

Zeitraum von 3 Stunden mehrfach beträufelt und anschließend entfernt wurden. Trifluralin und Amiprofos-Methyl wurden mit einer Mikropipette direkt in die leicht aufpräparierten Knospen eingebracht. Pro Knospe betrug das Lösungsvolumen dabei 50 µl. Der Ansatz der wässrigen Lösungen erfolgte mit einem Zusatz von 0,5 % DMSO sowie 0,05 % Tween 20. Trifluralin erwies sich als nur sehr schwer löslich, in den Arbeitslösungen ließen sich einzelne ungelöste Kristalle nicht vermeiden. Tabelle 12 fasst die verwendeten Wirkstoffkonzentrationen zusammen. Insgesamt wurden 14 diploide periklinalchimärische *Pelargonium*-Sorten behandelt, wobei zu allen Versuchsklonen je 5 unbehandelte Vertreter als Kontrollpflanzen kultiviert wurden. Die Aufschlüsselung der hier zusammengefassten Applikationsvarianten auf die einzelnen Sorten ergibt sich aus Tabelle 19 im Ergebnisteil.

Tabelle 12 Polyploidisierungsvarianten kumulativ, siehe auch Tab. 19

Mutagen	Konzentration	Anzahl behandelter Knospen
Kolchizin	0,25 %	268
	0,4 %	25
Trifluralin	0,05 %	80
	0,075 %	117
	0,1 %	129
APM	0,05 %	59

2.2.4.2 Ploidienachweise

Die Charakterisierung des Versuchsmaterials fand auf verschiedenen experimentellen Ebenen statt (Tab. 13) (nach PLASCHIL et al. 2003, CRAMER 1999, RÖSSEL 1990, TILNEY-BASSETT 1986). In den Jahren 2001 und 2002 erfolgte jeweils ein Screening aller sich aus behandelten Knospen entwickelnden Neutriebe auf Valenzerhöhung der L1-bürtigen Epidermis. Die Vermessung von Stomatalängsachsen als Nachweisverfahren für einen Polyploidisierungserfolg erfolgte bei einer Vergrößerung von 17x1,6x40 mit Hilfe eines Messokulars. Von jeweils 3 Blättern eines untersuchten Triebes wurden Epidermisabzüge angefertigt. Da bei Behandlungserfolgen sektorial ausgeprägte tetraploide Epidermissegmente zu erwarten sind, sollte so ein möglichst breit gefächerter Bereich abgedeckt werden.

Als phänotypisches Indiz für Mutanten der Konstitutionen TDx, DTx und TTx wurden leicht vergrößerte Blüten erwartet. Die Vermessung von Petalenoberflächen erfolgte über die Software „Image Tool for Windows“ anhand kalibrierter digitaler Fotos. Als repräsentativ für eine Blüte wurde die jeweils untere mittlere Petale angesehen.

Von Laubblättern wurden Frisch- und Dauerpräparate (2.2.2) gewonnen und auf Zellgrößenveränderungen in typischen Gewebepositionen untersucht. Von in Kunststoff

eingebetteten Sprossspitzenpräparaten wurden Mikrotomdünnschnitte angefertigt und im Hinblick auf Zellgrößenveränderungen im Sprossscheitel mikroskopisch analysiert.

Tabelle 13 Nachweisverfahren für Polyploidisierungserfolge auf verschiedenen experimentellen Ebenen (Erläuterungen im Text)

		Merkmal Polyploidisierung		
		histo/morphologisch	genetisch/cytologisch	vegetativ
apikale Schicht/ Deszendenz	L1	vergrößerte Stomata, Zahl der Plastiden in den Stomatageleitzellen erhöht, vergrößerte Epidermiszellen, größere Blüten	größere Zellkerne in der apikalen L1, Chromosomenzählungen in präparierten Sprossscheiteln	intraindividuelle Konkurrenzprozesse führen möglicherweise zu häufigeren Umlagerungen bzw. Entmischungen
	L2	vergrößerte Palisadenzellen, Blüten vergrößert, vergrößerte Pollenkörner, auch tetraporate Pollenkörner, Verschiebung von Musterproportionen	größere Zellkerne in der L2, Chromosomenzählungen in präparierten Sprossscheiteln, lässt sich mit tetraploidem Material kreuzen	
	L3	vergrößerte Mesophyllzellen im Blattzentrum, größere Laubblätter, Verschiebung von Musterproportionen	größere Zellkerne in der L3, Chromosomenzählungen in präparierten Sprossscheiteln, Mitosestadien in L3-bürtigen Wurzelspitzen	Adventivwurzelaustriebe repräsentieren i.d.R. die L3

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden von allen Sprossvarianten mit auffälligen Musterproportionen Pollenproben entnommen und mikroskopisch vermessen. Das Aufplatzen der Pollenkörner in wässrigen Präparationen ließ sich auch durch die Erhöhung des osmotischen Potenzials über einen Zuckerezusatz nicht vollständig verhindern. Zügiges Arbeiten sowie die Begrenzung der Probenumfänge auf jeweils 50 Messungen ermöglichten vergleichbare Ergebnisse. Die Pollenkörner tetraploider Sorten zeichnen sich neben erhöhten Durchmessern durch ein weiteres morphologisches Merkmal aus. Während auf diploider Ebene ausschließlich triporate Pollenkörner nachgewiesen wurden, sind auf tetraploidem Niveau vereinzelt tetraporate Körner nachweisbar. Sie wurden bei der Pollenvermessung registriert und liefern ein zusätzliches Indiz für Polyploidisierungserfolge (CRAMER 1999, PHILIPPI 1961). Auf diploider wie auf tetraploider Ebene können innerhalb der Gruppe der *Pelargonium x zonale*-Hybriden Testkreuzungen mit Eltern definierter Valenz zuverlässig als Methode der Ploidiebestimmung erhalten. Variegata Nachkommenschaften aus Kreuzungen mit chimärischen Mutterpflanzen erlauben es unbeabsichtigte Selbstungen -sie brächten ausschließlich einfarbige Nachkommenschaften- auszuschließen. Erfolgreiche Kreuzungen mit Vertretern des aktuellen Hochleistungssortiments liefern einen Beleg für die erfolgreiche Polyploidisierung der L2. Der karyologische Zustand von F1-Sämlingen aus Kreuzungen von Behandlungsvarianten mit aktuellen Sorten sollte über Quetschpräparate von Wurzelspitzen überprüft werden. Die Entnahme von Wurzelspitzen erfolgte vormittags, anschließend wurde 2 Stunden in 0,1 %iger Kolchizininlösung

inkubiert. Die Fixierung fand in CARNOY (Ethanol:Eisessig, 3:1) über Nacht bei Raumtemperatur statt. Nach mehrmaligem Aufkochen in filtrierter Karminessigsäure wurden Quetschpräparate angefertigt und mikroskopisch untersucht (BADR 1971).

2.2.5 TDZ-Gießversuch zur Adventivsprossregeneration

In Anlehnung an die von MURCH et al. (1997) sowie SANAGO et al. (1995) vorgestellten Regenerationsversuche wurden 25 getopfte (9 cm) tetraploide Jungpflanzen - hervorgegangen aus Sterilaussaaten eigener Kreuzungen - mit einer TDZ-Lösung (2,2 mg/l) behandelt. Aus Kostengründen musste allerdings auf die vollständige Bewässerung der Versuchspflanzen mit der Hormonlösung verzichtet werden. Die drei Monate alten Versuchspflanzen wurden zunächst bis auf die Sprossbasis zurückgesetzt. Über sechs Wochen hinweg wurde die leicht freigelegten Wurzelhalse 3 Mal wöchentlich mit 10-15 ml TDZ-Lösung beträufelt. Die Wasserversorgung der Pflanzen erfolgte in diesem Zeitraum zusätzlich über eine Mattenbewässerung von unten.

2.2.6 *In vitro*-Kulturverfahren

In vitro-Kulturverfahren kamen auf verschiedenen Ebenen zum Einsatz. Basis sämtlicher Ansätze waren Nährmedien nach MURASHIGE und SKOOG (1962) mit halbierten Makronährstoffkonzentration (Modification No 1A, Duchefa, NL) und 30 g/l Saccharose. Feste (7 g/l Agar, pH 5,8) und flüssige Nährmedien (pH 5,5) wurden 20 min (121 °C, 1,2 kg/cm²) autoklaviert. Die leicht abgekühlten Medien wurden anschließend mit einer sterilfiltrierten Vitaminmischung (Gamborg B5 Vitamin Mixture (GAMBORG et al. 1968), Duchefa, NL) sowie Wuchsstoffen versetzt. Standardkulturbedingungen waren 22 °C und 16 h Licht (4 x Philips Master TL-D R, 58 W/m²).

Sprosskulturen wurden auf ½ MS/B5 bei einem Zusatz von 0,5 mg/l IAA angelegt. Vermehrung und Verjüngung erfolgten über Triebspitzen auf dem gleichen Medium.

2.2.6.1 Sterilaussaat und Überführung

Sterilaussaaten wurden durchgeführt um einerseits Verluste durch Infektionen zu minimieren, zum anderen stand mit sterilen Sämlingen Material für Regenerationsversuche *in vitro* zur Verfügung. Bis zu 20 Samen wurden zunächst aus ihrer trockenen Fruchthülle herauspräpariert, kurz in Ethanol (70 %) gespült und anschließend in einem sterilen Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Natriumhypochlorid (1,3 %) überschichtet. Nach 20 Minuten auf einem Rotationsschüttler wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und mit sterilem Aqua dest. aufgefüllt. Nach kurzem Aufschütteln konnten die Röhrchen in Petrischalen entleert werden, in denen angeschnitten wurde. Mit dem Arbeiten im Wasserbad ließ sich das Wegspringen der hartschaligen Samen effektiv verhindern. Jeweils paarweise wurde in Pfisterröhrchen (ca. 10 ml ½ MS/B5, hormonfrei) ausgelegt. Pflanzen, die im Gewächshaus weiter kultiviert werden sollten, wurden 4 bis 6 Wochen nach der Aussaat auf sterile feuchte Erde in autoklavierbare Kunststoff-Kulturbedälter (Phytakon®) überführt. Nach dem Durchwurzeln wurden die Behälter mit locker aufliegendem Deckel im Gewächshaus aufgestellt.

2.2.6.2 Multiple Sprossbildung unter TDZ-Einfluss

Zwei Wochen nach dem Auflaufen wurden tetraploide Sämlinge in einen Regenerationsversuch auf TDZ-haltiges (0,44 mg/l) Festmedium ($\frac{1}{2}$ MS/B5) überführt.

Zerlegt in jeweils drei Fragmente (Kopfteil, Hypokotylteil, basales Ende) erfolgte die Kultivierung einzeln in Pfisterröhrchen wobei Blätter und Wurzeln zuvor entfernt wurden.

2.2.6.3 In vitro-Veredelungen

Gut durchwurzelte Sprosspräparate der tetraploiden Sorte 'Robe' fanden –zurückgeschnitten auf 2-4 cm– in 200 ml Erlenmeyerkolben als Unterlage Verwendung. Auf die zurückbleibenden Strünke wurden ca. 1,5cm lange sterile Glasröhrchen mit variierenden Durchmessern gestülpt. Weiße Sämlinge aus Kreuzungen mit 'Frank Headley 4x', 'Flower of Spring 4x' sowie 'Contrast 4x' wurden anschließend oberhalb des Wurzelhalses abgeschnitten und in die überstehenden Enden der Röhrchen gepresst.

„Verschmiert“ mit hormonfreiem Basalmedium (Abb. 10) konnte die Entwicklung der Präparate über mehrere Wochen verfolgt werden.

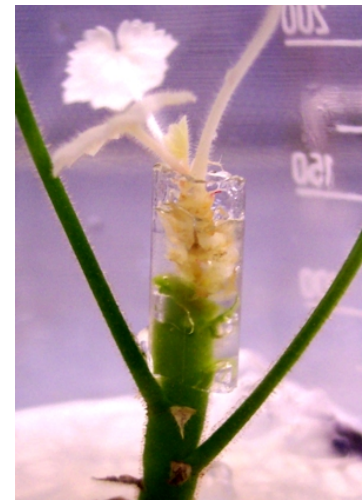


Abbildung 10 In vitro-Veredelungsverfahren

2.2.6.4 Aufbau von Kallussuspensionen

Das Ausgangsmaterial für die enzymatischen Verdauungen lieferten Kallussuspensionskulturen der Sorten 'Viktoria' und 'Perlenkette Orange'. Von pac® Elsner Jungpflanzen bereitgestelltes *in vitro*-Material wurde auf $\frac{1}{2}$ MS/B5 unter Zusatz von 3 mg/l IAA sowie 1 mg/l Zeatin zur Bildung von weißem, bröseligen Kallus angeregt. Dieser Kallus war zum Aufschütteln in 100 ml Erlenmeyerkolben geeignet (1 g/50 ml, 100 U/min) (Abb.11).

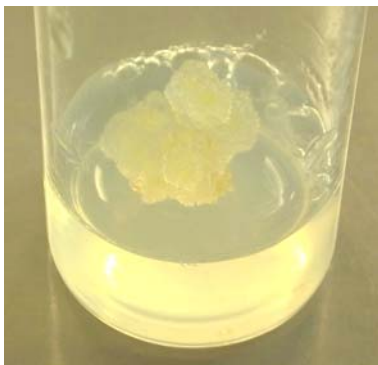


Abbildung 11 Weißer, bröseliger Kallus, wie er zum Aufbau von Suspensionen verwendet wurde

In die Kolben eingestellte sterile Objektträger dienten in der Aufbauphase zur Erhöhung der wirkenden Scherkräfte. Bei erkennbarer Proliferation wurden Subkulturen angelegt, wobei größere Kallusfragmente sukzessive ausgeschlossen wurden. Als geeignete Hormonkomponenten für die Kallussuspensionskultur erwiesen sich 1 mg/l IAA, 1 mg/l 2,4-D und 1 mg/l Zeatin. Bei einer Subkulturdauer von 16-18 Tagen wurden in 300 ml-Kolben jeweils 30 ml Suspension mit 70 ml Frischmedium versetzt. Alle Kulturen wurden beim Umsetzen mikroskopisch auf Kontaminationen geprüft. Die Charakterisierung des Wachstumsverlaufs der Flüssigkulturen erfolgte über die Ermittlung von Settled Cell Volume (SCV) und

Trockenmasse (nach BHOJWANI und RAZDAN 1983). Für das SCV wurden jeweils 10 ml Suspension möglichst homogen entnommen und in skalierten Zentrifugenröhrchen 10 min sedimentiert. Für das abgesetzte Zellvolumen ließen sich jeweils Mittelwerte aus drei Proben berechnen. Bestimmungen von Trockenmassen erfolgten, indem jeweils 10 ml der Zellsuspensionen durch 20 µm PE-Filter gespült und die Filterkuchen anschließend bei 60 °C über Nacht eingedampft wurden. Messwerte für jeweils drei ausgewogene Proben wurden gemittelt. Ein Vitalitätsnachweis erfolgte über den Nachweis von Esterase-Aktivität in intakten Zellen auf Basis von FDA (nach BHOJWANI und RAZDAN 1983) (Tab. 15).

2.2.6.5 Protoplastenkultur

Verdauung

Für Verdauungen vorgesehene Suspensionen wurden in einen 20 µm PE-Filter gegeben und mit CPW (Tab. 14) ohne Osmotikum gespült. Etwa 1 g des Filterkuchens wurde anschließend mit 3 ml der Enzymlösung versetzt und über Nacht (16 h) bei Raumtemperatur in Polystyrol-Petrischälchen (55 mm) dunkel inkubiert. Unter den gleichen Bedingungen fanden Verdauungen von Kotyledonensegmenten statt. Dazu wurden jeweils beide Keimblätter von sterilen Selbstungsnachkommenschaften der Sorte 'Lauretta' in feine Streifen geschnitten und mit 3 ml Verdauungsmedium angesetzt. Als geeignet erwies sich eine abgewandelte Enzymlösung nach NASSOUR und DORION (2002) (Tab. 14). Die Zugabe der Vitamine (B5) und Enzyme erfolgte jeweils nach dem Autoklavieren. Verwendung fanden die Zellulase Onozuka R10 (aus *Trichoderma viride*, Duchefa, NL) (1 %) sowie die Pektinase Macerocyme R10 (aus *Rhizopus sp.*, Duchefa, NL) (0,5 %). Der Enzymmix wurde jeweils sterilfiltriert auf Vorrat angesetzt und in Aliquoten tiefgefroren (-18 °C).

Tabelle 14 CPW, Cell and Protoplast Washing Solution (nach FREARSON et al. 1973); Enzymmix (nach NASSOUR und DORION 2002), Protoplastenmedium, Zusammensetzungen

CPW	Enzymmix	Protoplastenmedium
1480 mg/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	½ MS/B5 flüssig ohne Zucker, pH 5,8	½ MS/B5 flüssig, pH 5,8
27,2 mg/l KH_2PO_4	5 g/l PVP	5 g/l PVP
101 mg/l KNO_3	7 g/l MES	7 g/l MES
246 mg/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	95 g/l Mannitol	95 g/l Mannitol
0,16 mg/l KJ	Zellulase Onozuka R10 (1 %)	0,88 mg/l TDZ
0,025 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	Pektinase Macerocyme R10 (0,5 %).	

Aufreinigung

Im Anschluss an die enzymatische Lyse ließen sich zunächst grobe Fragmente durch mehrmaliges Aufsaugen in einer Pasteurpipette lösen. Anschließend wurde durch einen 200 µm Filter in Zentrifugenröhrchen gespült (CPW + 95 g/l Mannitol) (Tab. 14) und auf 15 ml aufgefüllt. Bei 80 g wurde 15min zentrifugiert (Swing-out-Rotor), der Überstand verworfen und anschließend erneut mit der Spüllösung auf 15 ml aufgefüllt. Nach einem weiteren Zentrifugieren (80 g, 15 min) wurde mit Floatinglösung (CPW +180 g/l Saccharose) auf 12 ml aufgefüllt und dabei der Bodensatz leicht aufgeschüttelt. Vorsichtig wurde mit 1,5 ml Waschlösung überschichtet und ein weiteres Mal zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes war eine erste mikroskopische Bonitur des Verdauungserfolges möglich. Die Quantifizierung der Präparationsergebnisse erfolgte über Zellzählungen in einer FUCHS-ROSENTHAL-Kammer. Vitalitätsnachweise wurden mit Evans-Blau und FDA (Tab. 15) durchgeführt.

Weiterkultur

Die Weiterkultur der aufgereinigten Protoplastensuspensionen sollte in flüssigen Nährmedien auf Basis von ½ MS/B5 stattfinden. Das Medium wurden der Präparation zunächst mit Osmotikum (95 g/l Mannitol) in der Regel 1:1 beigegeben (angestrebte Kulturdichte 30000 Zellen/ml) und nach einer Woche sukzessive durch mannitolfreie Nährlösungen ersetzt (0,5 ml alle 3 Tage). Regenerierende Mikrokallusse sollten auf feste Nährmedien überführt werden, auf denen die Sprossregeneration stattfinden sollte.

Tabelle 15 Vitalitätsnachweise für Protoplasten und Zellsuspensionen (nach BHOJWANI und RAZDAN 1983)

Evans-Blau	FDA
0,1 % Evans-Blau in 0,5M Mannitol	0,5 % FDA in Aceton (Stammlösung)
Ca-freie Waschlösung nutzen (W5, NEGRUTIU et al. 1987, Ca-frei, 22,5 g/l Glyzin)	1:1000 mit CPW (Arbeitslösung)
0,5 ml Farblösung mit 0,5 ml Präparation mischen, in 55 mm Petrischale betrachten	1:1 mit Suspension/Präparation, nach 10 min unter Blauanregung auf Objektträger betrachten

2.2.7 Antibiotikabehandlungen

Die Versuche mit den antibiotischen Wirkstoffen Spectinomycin, Rifampicin und Streptomycin wurden als Knospenbehandlungen im Gewächshaus durchgeführt. In drei aufeinander folgenden Vegetationsperioden seit 2002 wurden unterschiedliche Wirkstoffkonzentrationen sowie -kombinationen erprobt (Tab. 16). Zu den ursprünglichen Testpflanzen der tetraploiden Sorte 'Lauretta' kamen im Jahr 2004 sieben tetraploide Sorten (siehe Tab. 10) mit jeweils vier Pflanzen hinzu. Behandelt wurden zwischen 3 und 8 Apikal- und Lateralknospen pro Pflanze. Mit Hilfe einer Mikropipette wurden jeweils 50 µl der wässrigen Wirkstofflösung (Zusätze: 0,5 % DMSO, 0,05 % Tween 20) direkt in die leicht aufpräparierten Knospen appliziert. Behandelte Knospen wurden mit Farbbändern markiert und über die komplette Vegetationsperiode beobachtet.

Tabelle 16 Antibiotika-Applikationsvarianten

Jahr	Material	Wirkstoff	Konzentration
2002	12 Pflanzen, 41 Knospen	Spectinomycin	20, 50, 100 mg/ml
2003	24 Pflanzen, 100 Knospen	Spectinomycin	150 mg/ml
2004	52 Pflanzen, 232 Knospen	Spectinomycin Streptomycin Rifampicin	100 mg/ml (gesamt aus allen 4 Kombi- nationen)

2.2.8 Statistik und EDV

Die statistische Auswertung und grafische Aufbereitung der Daten wurden mit „SPSS für Windows 11.5.1“ sowie „Microsoft Excel 2000“ durchgeführt. Boxplots werden ohne Ausreißer und Extremfälle präsentiert, das heißt Werte mit einer Distanz von über 1,5 Boxlängen vom oberen bzw. unteren Rand wurden von der Darstellung ausgeschlossen.

Die Two-Step-Cluster-Analyse erfolgte bei automatischer Wahl der Cluster-Anzahl. Das Verfahren wurde von der SPSS Inc., USA entwickelt und beruht auf einem zweistufigen Algorithmus, in dessen Verlauf im Gegensatz zu herkömmlichen hierarchischen Verfahren auch Gruppenwechsel möglich sind (SPSS Inc. 2001).

Das für Petalenvermessungen verwendete Programm „Image Tools for Windows 2.0“ wurde an der University of Texas, San Antonio entwickelt und als Freeware bereit gestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Diploides Ausgangsmaterial

3.1.1 Chimärische Konstitution

Die Laubblattmuster aller in die Untersuchung einbezogenen diploiden Sorten beruhen auf periklinalchimärischen Sprossscheitelkonstitutionen. Die hellen Blattränder sind jeweils auf einen genetischen Defekt in L2-bürtigen Zellen zurückzuführen. Laubblattquerschnitte im Bereich der dunklen Binnenfelder aller untersuchten Pflanzen zeigen einen für xWG-Formen typischen Aufbau. Subepidermal ist auf der Blattober- und Blattunterseite jeweils ein Band farbloser Zellen zu erkennen. Im Untersuchungszeitraum konnten an 12 von 16 Sorten Sprossvarianten beobachtet werden. An der Sorte 'Hills of Snow' entwickelte sich ein GGW-Spross mit einem gleichzeitig verändertem Blütentyp (Abb. 12). Epidermisuntersuchungen sowie die Beobachtung von L1-Beteiligungen am Aufbau der Nebenblattränder erlaubten Rückschlüsse auf den Farbtyp



Abbildung 12 Chimärisches Ausgangsmaterial, Indizien auf verschiedenen Ebenen: links: Typischer Blattaufbau der GWG-Variante 'Sinbar', Mitte: 'Hills of Snow' GWG und Sprossvariante GGW, rechts: 'Mrs Parker' GWW aus GWG *in vitro*

der apikalen L1. Auf diploider Ebene konnten nur für die Sorten 'Mrs Parker' und 'Wilhelm Langguth' Pflanzen mit chlorophylldefekten Epidermiszellen identifiziert werden. Alle GWG-Varianten zeigen im Bereich der Laubblätter nur sehr selten die Beteiligung L1-bürtiger Zellen am Mesophyllaufbau. Perikline Aufspaltungen grüner Epidermen am Blattrand bringen charakteristische „Ohren“ hervor (vergl. 3.3.1). Sterilkulturen von Sprossvarianten der Konstitution GWW und WWW aus 'Mrs Parker' verdeutlichen den Einfluss grüner Epidermiszellen auf den Farbphänotyp der kultivierten Formen *in vitro* (Abb. 12, rechts). Chlorophyllführende Epidermiszellen geben Monektchimären der Konstitution GWW dort einen leichten Grünstich. Im Gewächshaus bleiben GWG-Formen hingegen (am Blattrand) unauffällig.

Blattränder der Sorten 'Flower of Spring' sowie 'Hills of Snow' neigen insbesondere in den Wintermonaten zum Ergrünen. Jüngste Blätter aller gelblich-weißen Varianten weichen in der Färbung von den adulten Formen ab (Abb. 9). Vergleichsweise schmale Blattränder besitzen die Sorten 'Mrs Parker' und 'Wilhelm Langguth'. Das Laub dieser beiden Klone ist deutlich gewölbt. Sprossscheitellängsschnitte diploider Formen (geprüft: 'Mrs Pollock', 'Hills of Snow',

'Frank Headley', 'Contrast' und 'Wilhelm Langguth') waren anatomisch unauffällig, das heißt Chlorophylldefekte wirken sich nicht auf die Vitalität (Zellgröße) der zweiten apikalen Zellschicht aus.

3.1.2 Testkreuzungen mit variegaten *Pelargonium x zonale*-Sorten

Reziproke Testkreuzungen mit Vertretern des variegaten Sortiments an *P. x zonale*-Hybriden lieferten Aufschluss über die genetische Struktur des Versuchsmaterials in zweierlei Hinsicht. Zum einen konnte der extranukleäre Ursprung von Chlorophylldefekten im bestehenden Sortiment nachgewiesen werden. Zum anderen ließ sich der diploide Zustand des Versuchsmaterials auf diese Weise zusätzlich verifizieren (Triploide Typen aus Kreuzungen $2x \times 4x$ sind bei *P. x zonale* nicht bekannt). Kreuzungen im diploiden Sortiment ergaben das in Tabelle 17 zusammengefasste Ergebnis. Die Sorte 'Westdale Appleblossom' erwies sich als steril. Die vollständig gefüllten Blüten (Rosebud-Typ) der Pflanzen erlaubten weder ihre Verwendung als Pollenspender noch als Mutterpflanze. 'Mrs Pollock' war als Vaterpflanze ungeeignet, brachte jedoch als Mutter Samenansätze. Kreuzungen mit der Sorte 'Crystal Palace Gem' brachten in keinem Fall variegated Nachkommenschaften, F1-Sämlinge beider Kreuzungsrichtungen waren phänotypisch grün bzw. hellgrün. Alle anderen Kombinationen lieferten – mit einer Ausnahme ('Contrast' x grün erreichte nicht das Boniturstadium)- variegated Nachkommenschaften in den getesteten Kreuzungsrichtungen (Abb. 13 und 14). Das Nebeneinander grüner und weißer Bereiche auf Kotyledonen und Laubblättern der Sämlinge gilt als Indiz für biparentale Erbgänge (siehe 1.3). Die Farbdefekte der beteiligten Elternpflanzen sind demnach extranukleär codiert.



Abbildung 13 Variegater Sämling aus einer Kreuzung mit 'Sophie Dumaresque' (w x g)



Abbildung 14 Segregationsmuster an einer vierjährigen Pflanze aus grün x 'Contrast'

Auf diploider Ebene zeichneten sich wesentliche Unterschiede in den Segregationsmustern variegater Sämlinge ab. Während Nachkommenschaften der Sorten 'Sophie Dumaresque' und 'Contrast' sehr fein gescheckte Blätter aufwiesen, brachten Kombinationen unter Beteiligung von 'Wilhelm Langguth' ausschließlich Sämlinge mit wenigen, häufig symmetrischen Sektoren hervor. Aus Platzgründen wurden diploide Nachkommenschaften - nach der Bonitur bei entwickeltem

zweitem Laubblatt – zum größten Teil verworfen. Vier Jahre nach der ursprünglichen Kreuzung können an einer erhaltenen Pflanze (Kreuzung: grün x 'Contrast') nach wie vor Entmischungsprozesse in Laubblättern beobachtet werden (Abb. 14).

Die Entstehung periklinalchimärischer Laubblattvarianten konnte nach Kreuzungen auf diploider Ebene dokumentiert werden. An einer GWG-Form aus 'Sophie Dumaresque' x grün gingen in kurzer Folge zwei Sprossvarianten mit modifizierten Musterproportionen hervor (Abb.15).

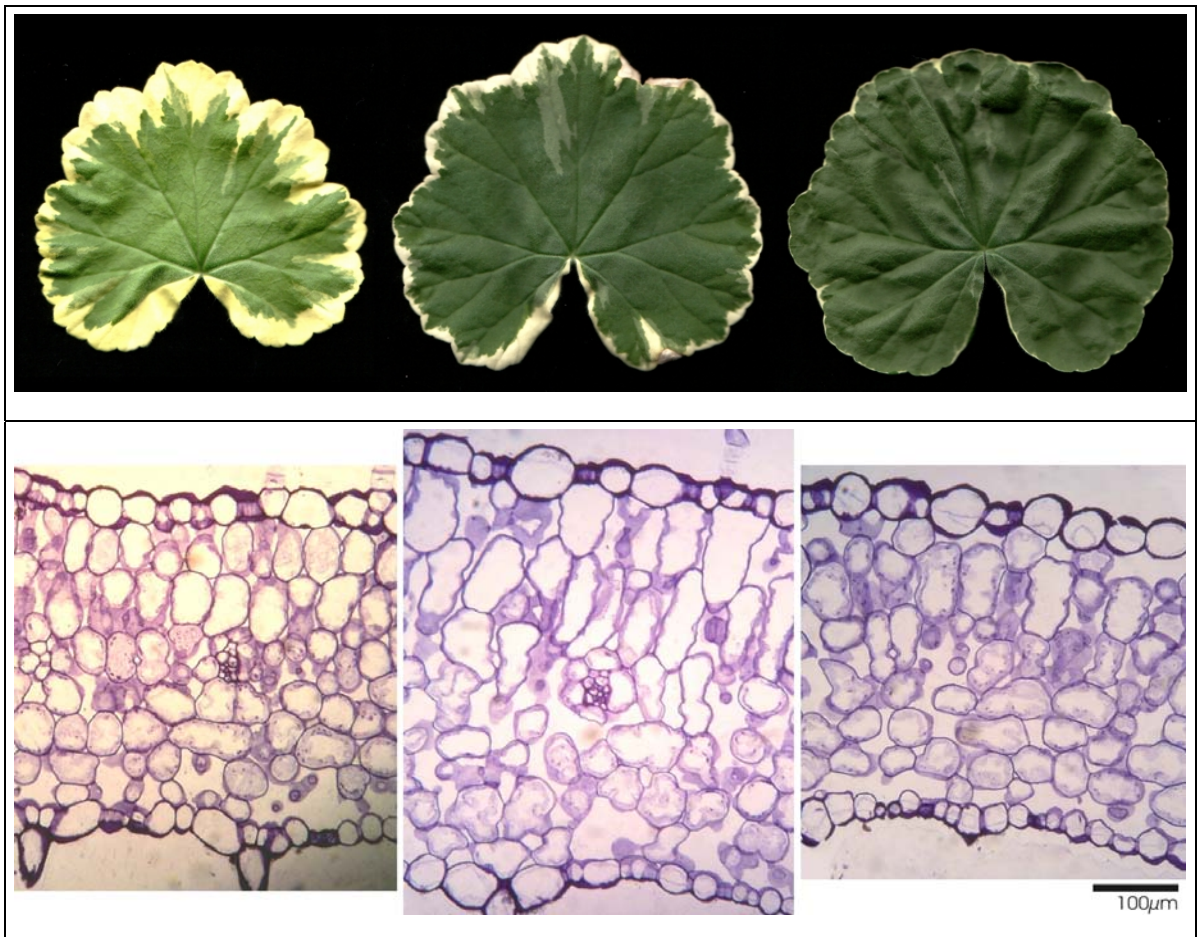


Abbildung 15 oben: 'Sophie Dumaresque' x grün, Laubblatt einer entstandenen Weißrandpflanze (links). Daneben Blätter der zwei spontan aufgetretenen Sprossvarianten. unten: Querschnitte aus Laubblattzentren der drei Formen. (siehe Text)

Die Variante mit mittelbreitem Rand bildet subepidermal auffallend große Palisadenzellen. Abbildung 15 (unten, mittig) zeigt einen Bereich mit farblosen Zellen in mehreren Ebenen, die auf extraapikale Reduplikationen zurückgeführt werden müssen. Abkömmlinge der L2 liegen auch in der Normalvariante (unten, links) mitunter in mehreren Lagen übereinander. Querschnitte aus dem Zentrum von Schmalrandblättern (Abb. 15 rechts) zeigen Lücken in der L2-bürtigen Zellschicht. Auch hier lassen sich unerwartet große, farblose Zellen in subepidermaler Lage finden. Eine Korrelation zwischen der Breite farbmarkierter Blattränder und der beobachtbaren Zellgröße in L2-bürtigen Geweben lässt sich für das Material nicht nachweisen.

Flächenanteile farbmarkierter Zonen bei der Ausgangssorte 'Mrs Parker' und einer aus 'Mrs Parker' x grün hervorgegangenen F1-Weißrandvariante unterscheiden sich deutlich voneinander (Abb.16).



Abbildung 16 'Mrs Parker' (links) und Laubblatt einer GWG-Variante aus 'Mrs Parker' x grün



Abbildung 17 'Crystal Palace Gem', Selbstungsnachkommenschaft

Selbstungen der Sorte 'Crystal Palace Gem' mit anschließender Sterilaussaat brachten neben grünen und hellgrünen Sämlingen weißgelbe Nachkommenschaften mit eingeschränkter Vitalität (Abb. 17).

Von 128 oberflächensterilen Samen aus Selbstungen der Sorte 'Frank Headley' konnten 38 *in vitro* zur Keimung gebracht werden. Alle Sämlinge waren weißlich und in ihrer Entwicklung gehemmt. Bestäubungen der diploiden 'Wilhelm Langguth' mit Pollen tetraploider Sorten (50 markierte Blüten) führten zur Entwicklung charakteristischer „Schnäbel“. In keinem Fall entwickelten sich keimfähige Samen.

Tabelle 17 Reziproke Kreuzungen variegater *P. x zonale*-Sorten mit grünen Testeltern

♀		♂	geerntete Samen	ausgelegte Samen	gekeimt	Anzahl bonitierter Sämlinge*	grün	hellgrün	weiß**	variegat	
	'Bette Shellard'	grün	95	30	24	18	11	0	X	7	39%
	'Cherry Cocktail'		19	17	16	3	1	0	X	2	67%
	'Crystal Palace Gem'		114	30	27	25	21	4	0	0	0
	'Contrast'		41	30	20	0	0	0	X	0	0
	'Flower of Spring'		217	130	103	99	88	0	X	11	11%
	'Frank Headley'		57	30	29	27	26	0	0	1	4%
	'Hills of Snow'		39	34	29	22	21	0	X	1	5%
	'Mrs Parker'		197	197	n.e.	125	59	0	X	66	53%
	'Mrs Pollock'		143	30	18	4	2	0	X	2	50%
	'Retahs Crystal'		8	8	7	6	3	0	0	3	50%
	'Sinbar'		544	130	n.e.	110	79	0	0	31	28%
	'Sophie Dumaesque'		197	30	30	7	1	0	X	6	86%
	'Southern Charm'		15	14	14	9	7	0	X	2	22%
	'Wilhelm Langguth'		225	225	n.e.	137	80	0	0	57	42%
grün	'Crystal Palace Gem'		474	60	54	52	45	7	0	0	0
	'Contrast'		35	29	17	15	5	0	0	10	67%
	'F. of Spring'		105	30	27	26	23	0	X	3	12%
	'Frank Headley'		63	30	26	22	7	0	X	15	68%
	'Henry Cox'		351	100	n.e.	88	83	0	0	5	6%
	'Mrs Parker'		443	130	123	112	88	0	X	24	21%
	'Sinbar'		130	130	n.e.	112	109	0	0	3	3%
	'W. Langguth'		300	n.e.	n.e.	249	231	0	0	18	8%

* Bonitur bei entwickeltem 2. Laubblatt; Sämlinge aus angeschnittenem Saatgut zeigen an den Kotyledonenspitzen mitunter Aufhellungen in Folge der Verletzungen; ** beobachtet, jedoch vor der Bonitur abgestorben; n.e.: nicht erfasst

3.2 Polyploidisierung

Die Mutationsexperimente wurden parallel an 14 diploiden, variegaten *Pelargonium*-Sorten durchgeführt. Die Sorte 'Southern Charm', für die ein extranukleärer Defekt nachgewiesen werden konnte, erwies sich auf Grund ihrer Schwachwüchsigkeit als behandlungsungeeignet. Unter Vernachlässigung eines Sorteneinflusses auf den Behandlungserfolg stellt Tabelle 18 die Versuchsergebnisse der Jahre 2001-2004 kumulativ zusammen. Von den eingesetzten Wirkstoffen erwies sich in den getesteten Konzentrationen einzig Trifluralin als effektiv. Bezogen auf die L2 kann die Konzentration von 0,075 % Trifluralin als wirksamste Behandlungsvariante statistisch gesichert werden (Einzelvergleichsverfahren (k x 2-Felder-Kontingenztafel) nach BORTZ (2000)).

Tabelle 18 Kumulatives Ergebnis der Polyploidisierungsversuche (2001-2004)

Mutagen	Konz.	Anzahl beh. Knospen	erfolgreich in L2	erfolgreich in L1 (3.2.2)	erfolgreich in L3 (3.2.2)
Kolchizin	0,25%	259	2	0	0
	0,4%	25	0	0	0
Trifluralin	0,05%	80	3	4	2
	0,075%	121	10	nicht geprüft	3
	0,1%	125	2	6	0
APM	0,05%	59	0	0	0

An periklinalchimärischen *Pelargonium*-Weißrandsorten vorgenommene Knospenbehandlungen und die in der Folge registrierten cytochimärischen Varianten fasst Tabelle 19 zusammen. Alle unbehandelten Kontrollpflanzen blieben im Beobachtungszeitraum unauffällig.

Es muss festgehalten werden, dass erfolgreich polyploidisierte Formen über den gesamten Untersuchungszeitraum entstanden. Dabei war der zwischenzeitliche Rückschnitt des Versuchsmaterials nicht zu vermeiden. Wie die experimentellen Ergebnisse an farbmarkierten F1-Pflanzen zeigen, besitzen Schnittmaßnahmen einen wesentlichen Einfluss auf die apikale Etablierung zunächst sektorial beschränkter Merkmale.

Dass partiell polyploidisierte, periklinalchimärische Laubblattvarianten sich recht deutlich von den Ausgangsprossen unterscheiden (Abb. 23-27), darf als wesentliches Untersuchungsergebnis betrachtet werden. Die Sicherheit in der Identifizierung auffälliger Sprosssegmente nahm mit dieser Erkenntnis über die Dauer der Untersuchung zu.

Der Zeitfaktor, die Durchführung von Schnittmaßnahmen und eine verbesserte Selektionskompetenz besaßen einen wesentlichen Einfluss auf die Auswertung der somatischen Mutationsversuche.

Tabelle 19 Polyploidisierungserfolge detailliert (Erläuterungen siehe 3.2.1 und 3.2.2)

Sorte	Anzahl behandelter Knospen/ Erfolgreich in Position											
	Kolchizin				Trifluralin						APM	
	0,25 %		0,4 %		0,05 %		0,075 %		0,1 %		0,05 %	
'Bette Shellard'	8				5	L1	5	L2	8	L2	9	
'Cherry Cocktail'	20				10		11		5	2x L1	2	
'Contrast'	18				7	L2	7	L3	9	L1	2	
'Flower of Spring'	32		4		10	L2	29	2xL2	14	L1		
'Frank Headley'	15				8	L2, L3	10		10		4	
'Hills of Snow'	15				5		7	4x L2,L3	3	L1	9	
'Mr Henry Cox'	9		5									
'Mrs. Parker'	44		5		5		16		12		13	
'Mrs Pollock'	9				4	L1, L3	13	L2,L1+L3	12	L1	4	
'Retahs Crystal'	15				6	L1			12		4	
'Sinbar'	27				5				12	L2		
'S. Dumaresque'	16				5		9	L2	14		2	
'W. Appleblossom'					10	L1	14	L2	14		7	
'W. Langguth'	31	2x L2	11								3	

3.2.1 Polyploidisierung der L2

Behandlungserfolge für die sporogene L2 ließen sich auf verschiedenen experimentellen Ebenen nachweisen. Im Verlauf der Untersuchung wurde deutlich, dass periklinalchimärische Laubblattvarianten mit ihren Musterproportionen zuverlässig Hinweise auf Valenzerhöhungen einzelner apikaler Schichten liefern. Sprosse mit tetraploider, farbdefekter L2 zeichnen sich durch deutlich breitere Laubblattränder aus (Abb. 23-27). Nur in einem Fall konnte ein auffällig verbreiteter weißer Blattrand nicht auf eine Polyploidisierung zurückgeführt werden. Ein trifluralinbehandelter Trieb der Sorte 'Mrs Parker' weist die typische Musterproportion einer xTD-Variante auf (Abb. 28), histologische Untersuchungen konnten jedoch keine Valenzerhöhung nachweisen. Abgesehen von der gefüllt blühenden Sorte 'Westdale Appleblossom' und der männlich sterilen 'Mrs Pollock' lieferten mikroskopische Pollenuntersuchungen Belege für Polyploidisierungserfolge (Abb. 18-20).

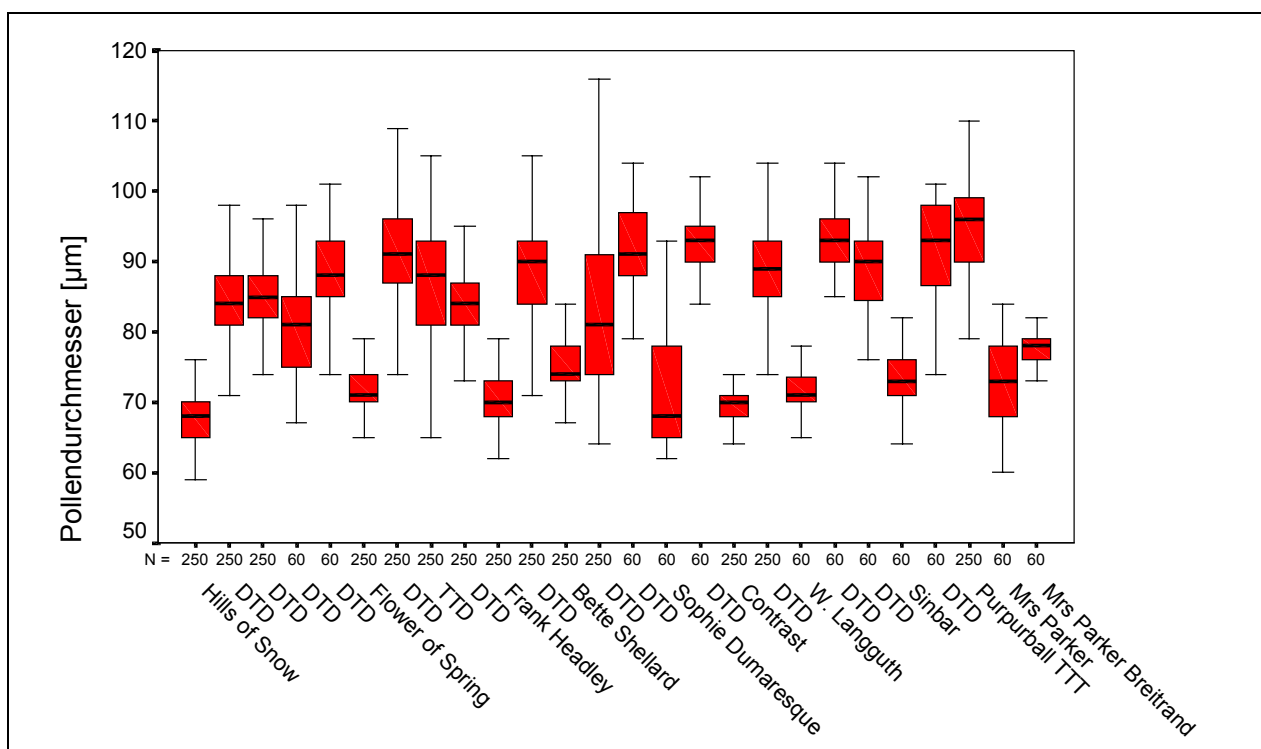


Abbildung 18 Pollendurchmesser diploider Sorten im Vergleich zu tetraploiden Behandlungsvarianten

Einzelvergleiche von Ausgangsformen und ihren Variantensprossen zeigten jeweils signifikante Größenunterschiede bei den ermittelten Pollendurchmessern (U-Test, verteilungsfrei). Nur 5 von 26 Datenreihen erwiesen sich als normalverteilt (K-S-Anpassungstest) bei überwiegend linksschiefer Distribution. Mit einer Ausnahme ermittelt die TwoStep Cluster-Analyse 2 Gruppen entsprechend den prognostizierten Valenzen (Abb. 20). Die histologisch unauffällige Breitrandvariante aus 'Mrs Parker' wird den tetraploiden Varianten zugeordnet. Während das diploide Ausgangsmaterial ausschließlich triporate Pollenkörner hervorbringt, konnten für alle erfolgreich behandelten Sprosse auch tetraporate Mikrosporen in der mikroskopischen Aufsicht nachgewiesen werden (Abb. 19).

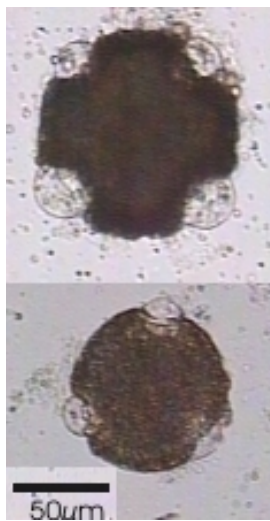


Abbildung 19 'F. of Spring', tetraploides Pollenkorn einer 4x-Variante (oben) und einer 2x-Vergleichspflanze

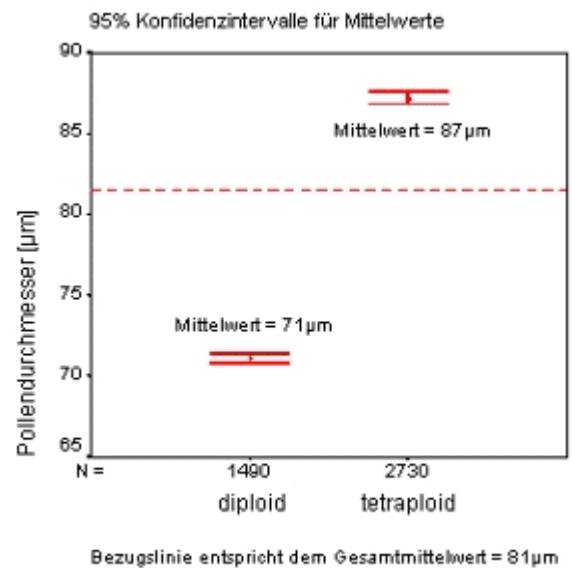


Abbildung 20 TwoStep Cluster-Analyse zu den Pollenmessungen (Abb. 18)

Für eine L2-tetraploide Variante aus 'Flower of Spring' sowie die tetraploide Sorte 'Melocherry' wurden Anteile von 5,6 % bzw. 5,2 % ($n=250$) ermittelt ('Hills of Snow 4x': 3,2 %, 'Bette Shellard 4x': 1,2 %). Abgesehen von der Variante aus 'Mrs Parker' ließen sich für alle entstandenen Breitrandspresse Zellvergrößerungen in typischerweise L2-bürtigen Gewebeschichten nachweisen. Laubblattdünnschnitte zeigten deutlich vergrößerte subepidermale Palisadenzellen (Abb.21 und 22). Die parallel entstandenen Varianten von 'Flower of Spring 4x' (3 Sprosse) und 'Hills of Snow' (4 Sprosse) weisen jeweils identische Laubblattmusterungen auf.



Abbildung 21 'Flower of Spring', Laubblattquerschnitt aus dem grünen Binnenfeld



Abbildung 22 'Flower of Spring', Variante mit tetraploider L2, Blattquerschnitt aus dem Binnenfeld



Abbildung 23 'Sophie Dumaresque', Spross mit tetraploider L2 (links)



Abbildung 24 'Wilhelm Langguth', Spross mit tetraploider L2 (rechts)



Abbildung 25 'Contrast', Spross mit tetraploider L2 (rechts)



Abbildung 26 'Flower of Spring', Spross mit tetraploider L2 (links)



Abbildung 27 'Westdale Appleblossom' mit vermutlich tetraploider L2 (links)



Abbildung 28 'Mrs Parker', histologische Befunde sprechen gegen eine Polyploidisierung der L2 des Variantensprosses (rechts)

Der Übergangsbereich zwischen dem hellen Blattrand und dem Binnenfeld ist durch das Nebeneinander tetraploider und diploider Zellen gekennzeichnet (Abb. 29).

Die Laubblattgröße der L2-tetraploiden Typen wird augenscheinlich von der Wüchsigkeit der Variantensprosse, dem Ausmaß der L3-Beteiligung am Mesophyllaufbau sowie der Assimilationsunfähigkeit chlorophylldefekter Gewebe beeinträchtigt und kann daher nicht als Selektionsparameter herangezogen werden (Abb. 33). Dem gegenüber liefern Blütenblattgrößen Indizien für Valenzerhöhungen der L2. Abbildung 30 fasst ermittelte Petalenwerte für ausgewählte Varianten zusammen (jeweils

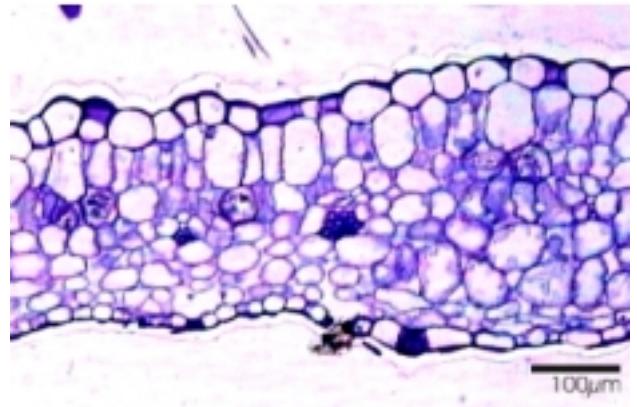


Abbildung 29 Übergang aus dem weißen Randbereich (rechts) ins grüne Binnenfeld einer vermutlich L2-tetraploiden Behandlungsvariante aus 'W. Appleblossom' im Querschnitt

untere, mittlere Petalen). Alle polyploidisierten Formen besitzen gegenüber den unbehandelten Vergleichsvarianten vergrößerte Petalen, wobei der Einfluss tetraploider L1-Deszendenz auf die Petalengröße vergleichsweise gering ist (Abb. 31). Die normalverteilten Messwerte erlauben jeweils die signifikante Unterscheidung zwischen Sorten und aus ihnen hervorgegangenen Varianten mit tetraploider L2 (SHAPIRO-WILK-Anpassungstest, T-Test).

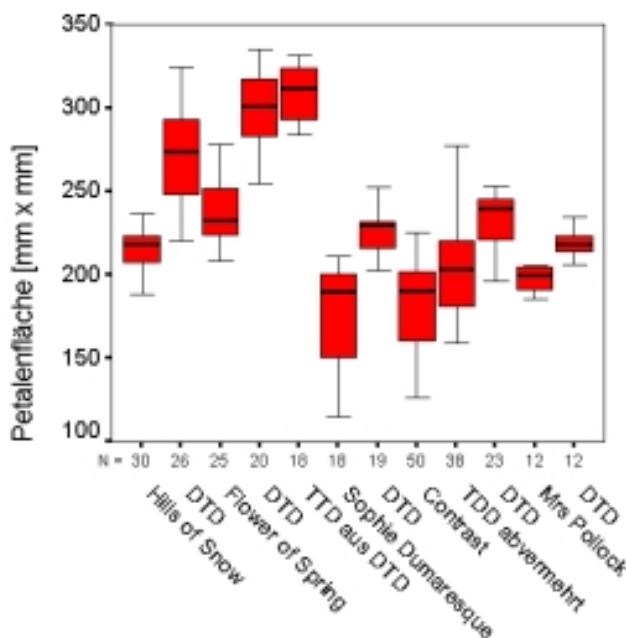


Abbildung 30 Blütengrößen ausgewählter Sorten und L2-tetraploider Varianten im Vergleich

Die histogenetische Stabilität der ploidiechimärischen Varianten kann erst abschließend beurteilt werden, wenn es gelingt aus den Sprossen klonale Bestände aufzubauen. Im Untersuchungszeitraum liefern die beobachteten Triebe keinen Hinweis auf eine erhöhte Neigung zu Gewebeumlagerungen. An 'Frank Headley' (GWG/DTG) konnte die Entstehung einer GWW/DDT-Form registriert werden. Sie wurde auf tetraploider Ebene erfolgreich in die Kreuzungen einbezogen. An derselben Pflanze entwickelte sich zeitgleich ein Spross mit der Konstitution GGW/DDT. Das parallele Auftreten beider Varianten ist möglicherweise auf Schnittmaßnahmen zurückzuführen, die für die erfolgreiche Etablierung der L2-tetraploiden Form notwendig waren (Abb. 32).

Der abvermehrte Variantenspross mit der Konstitution GGW/DDT konnte als Referenz für die Beurteilung von DDT-Formen genutzt

werden (Abb. 42).

Stomatauntersuchungen an 'Flower of Spring'-Formen mit tetraploider L2 zeigten in einem Fall die Perforation der apikalen Außenkomponente an. Der entstandene WWG/TTD-Spross besitzt farblose Stomatazellen sowie gegenüber der DTD-Form leicht vergrößerte Blüten (Abb. 30 und 34). Aus gärtnerischer Sicht stellen die geschaffenen *Pelargonium*-Weißrandvarianten mit tetraploider L2 keine Verbesserung des bestehenden Sortiments dar. Die Abvermehrung der Breitrandformen gestaltete sich überaus problematisch. Der Flächenanteil chlorophylldefekter Areale auf den Laubblättern erreicht offenbar Ausmaße, die die autotrophe Existenz der Variantensprosse nahezu unmöglich machen (Abb. 33).

Im Untersuchungszeitraum gelang es nur in einem Fall parallele Valenzserhöhungen in mehr als einer Scheitelschicht eines Sprosses nachzuweisen (3.2.2). Insbesondere xTT-Varianten, von denen eine ausgewogenere Laubblattmusterung erwartet wird, konnten bislang nicht identifiziert werden.

Für den kombinationszüchterischen Ansatz stehen im Frühjahr 2006 Sprossvarianten von insgesamt acht Plasmotypen zur Verfügung (3.3).



Abbildung 31 'Contrast', Blütengrößen von Ploidievarianten im Vergleich



Abbildung 32 Sprossvariation an 'Frank Headley' nach Trifluralin-Behandlung. GGW- und GWW-Sektor auf einem Laubblatt. Die weiße Gewebekomponente ist tetraploid.



Abbildung 33 'H. of Snow', Laubblätter der Ausgangsform (oben) und einer in der L2 tetraploiden Variante

3.2.2 Polyploidisierungen von L1 und L3

Valenzerhöhungen nicht sporogener Gewebeschichten wurden im Hinblick auf die praktische Verwertbarkeit von Cytochimären verfolgt. Ergebnisse zur Untersuchung L1-bürtiger Epidermen fasst Abbildung 34 zusammen. Insgesamt konnten im Anschluss an Mutagenbehandlungen zehn Sprossvarianten mit vergrößerten Spaltöffnungen identifiziert werden. 17 von 20 ermittelten Datensätzen erwiesen sich als normalverteilt (SHAPIRO-WILK-Anpassungstest). Die bezüglich der Verteilungsannahme wenig anfällige TwoStep Cluster-Analyse ermittelt zwei Gruppierungen, die den Ploidiekriterien entsprechen (Abb. 35 und 36). Sortenübergreifend lässt sich für die ermittelten Cluster ein Größenverhältnis von 1:1,4 errechnen.

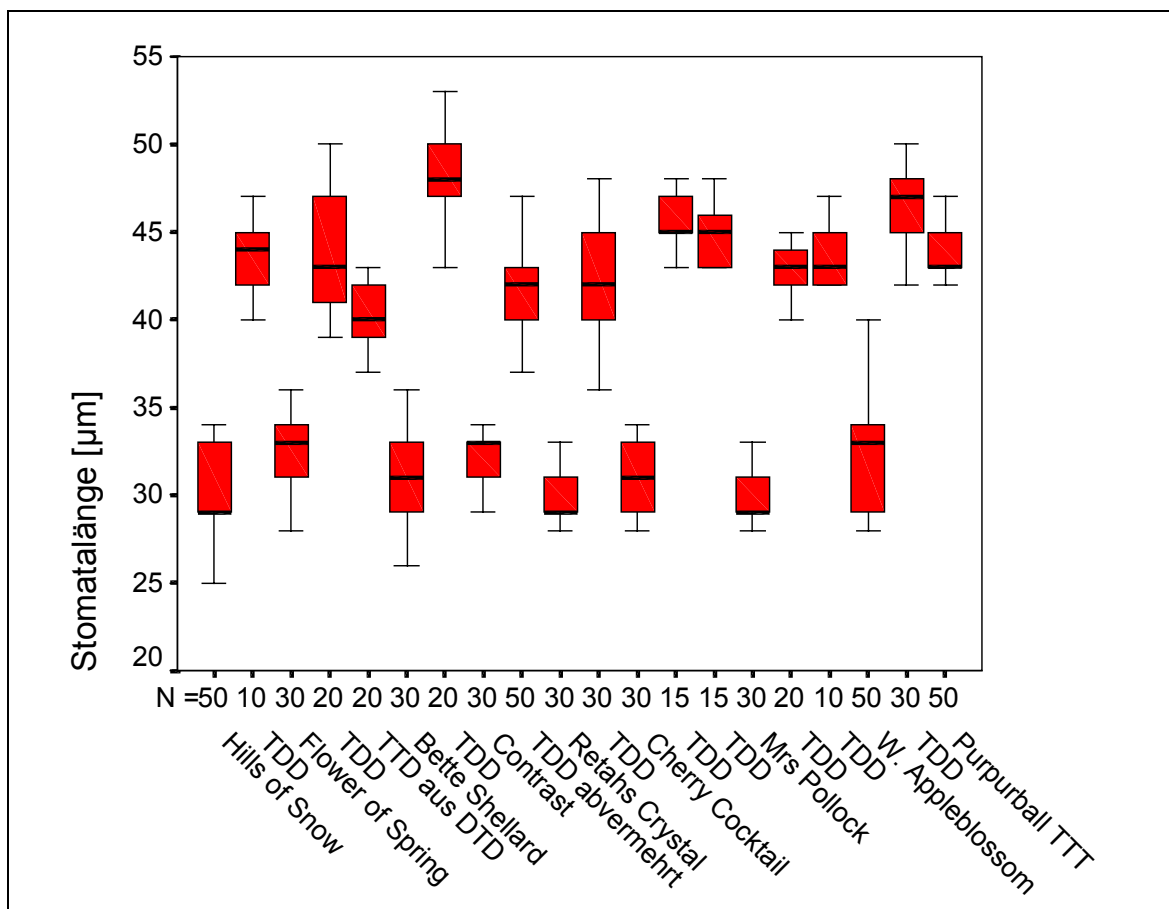


Abbildung 34 Stomatalängen von Ausgangsformen und epidermal tetraploiden Variantensprossen im Vergleich

Der Einfluss einer L1-Valenzerhöhung auf das morphologische Erscheinungsbild der abvermehrten Variante 'Contrast' TDD beschränkt sich auf leicht vergrößerte Blüten (Abb. 30 und 31). Im Bereich der Laubblätter bleibt die GWG/TDD-Form unauffällig. Insbesondere Beteiligungen farbmarkierter L1-bürtiger Zellen am Aufbau des Blattrandmesophylls bleiben Einzelfälle. Grüne L1-Derivate sind an den Stipelrändern der Trichimäre regelmäßig zu beobachten, sie ermöglichen die Verifikation der GWG-Variante im Gewächshaus. Die aufwändigen Reihenuntersuchungen L1-bürtiger Epidermen wurden im Jahr 2004 nicht durchgeführt, so dass ein nahe liegender bevorzugter

Behandlungserfolg für die exponierte äußerste Zellschicht nicht gesichert werden kann.

Untersuchungen bezüglich eines zunächst morphologisch unauffälligen Merkmals tragen einen Unsicherheitsfaktor, so dass die Zahl der Behandlungserfolge für die L1 tendenziell nach oben zu korrigieren ist. Die Untersuchung von Laubblattepidermen kann immer nur die Ploidieverhältnisse im ausgewählten Sektor widerspiegeln, die Gewinnung stabil periklinalchimärischer TDD-Varianten erfordert wiederholte Nachuntersuchungen, deren Aufwand durch die zu erwartenden nur leicht vergrößerten Blütenvarianten nicht gerechtfertigt erschien. Anders als bei den morphologisch auffälligen L2-Varianten ist es im Gewächshaus

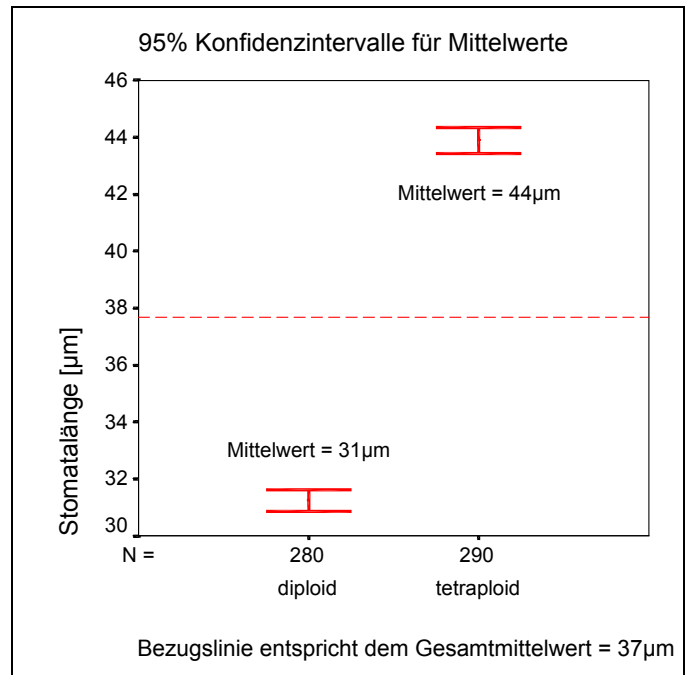


Abbildung 35 TwoStep Cluster-Analyse der ermittelten Stomatawerte

schwierig über gezielte Schnittmaßnahmen auf den Austrieb ausgewählter Lateralsprosse einzuwirken. Nach Abvermehrung von Sprossen mit tetraploiden Epidermissectoren zeigte sich, dass die stabile Etablierung zunächst mesochimärisch ausgeprägter Polyploidisierungen in der apikalen L1 überwiegend nicht stattfand. Neben den Reihenuntersuchungen von Epidermen in den ersten beiden Versuchsjahren wurden alle Sprosse mit tetraploider L2 auf den Ploidiestatus der L1 überprüft. Für eine Variante aus 'Flower of Spring' (WWG/TTD) konnte eine diektochimärische Konstitution nachgewiesen und auf eine L1-Perforation zurückgeführt werden.

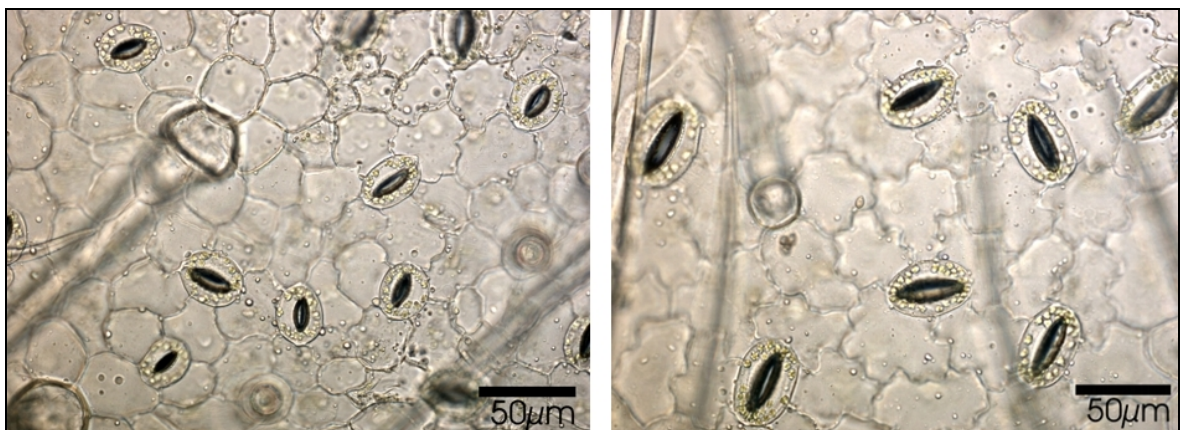


Abbildung 36 'Bette Shellard', Epidermisabzüge, Ausgangsvariante (links) und eine Variante mit tetraploider Epidermis

Im Anschluss an die Mutagenbehandlungen wurden an 'Hills of Snow', 'Frank Headley', 'Contrast' und 'Mrs Pollock' Blätter mit auffällig schmalen hellen Rand beobachtet (Abb.37-40). Die abschließende cytologische Beurteilung von L3-Komponenten der auffälligen Triebe ist erst nach deren Abvermehrung über Wurzelspitzenpräparate bzw. nach Individualisierung der internalen Schicht über Pollenmessungen sicher vorzunehmen. Vorliegende histologische Befunde legen jedoch die cytochimärische Natur der Sprosse nahe. Laubblattquerschnitte im grünen Binnenfeld der Schmalrandvarianten offenbaren vergrößerte Zellen unterhalb der im Normalfall L2-bürtigen Palisaden (Abb. 41 und 43).



Abbildung 37 'Hills of Snow', Schmalrandvariante (links), Ausgangsform (unten) und L2-tetraploider Trieb

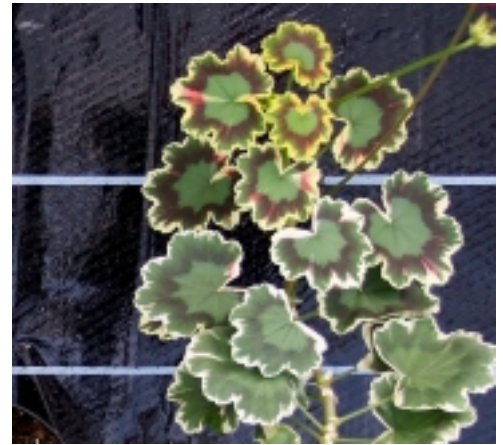


Abbildung 38 'Mrs Pollock', Schmalrandspross

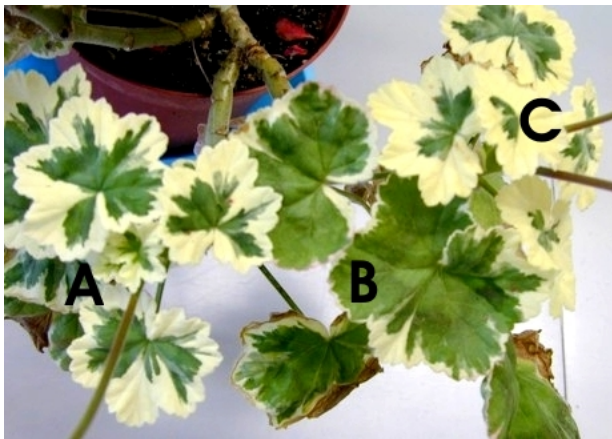


Abbildung 39 'Frank Headley', Ausgangsform (A), Schmalrandblätter (B), und 4x-L2-Variante (C) (vergl. Abb. 41)



Abbildung 40 'Contrast', Laubblatt mit sektorial verengtem Rand entstanden an der Basis eines Schmalrandsprosses

An 'Mrs Pollock' konnten zwei phänotypisch vergleichbare Variantensprosse an verschiedenen Pflanzen dokumentiert werden. Erste Voruntersuchungen eines aufgebauten Klon lieferten aufschlussreiche Sprossscheitellängsschnitte und führten zur Identifikation der Form 'Mrs Pollock TDT' (Abb. 44 und 45).

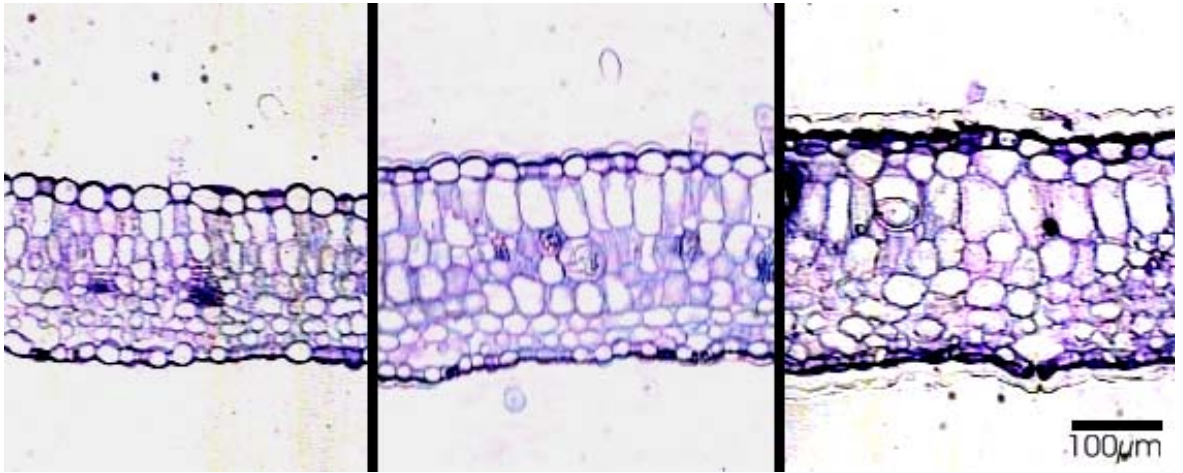


Abbildung 41 Blattquerschnitte von 'Frank Headley' (links), der Variante mit tetraploider L2 (Mitte) sowie einer vermutlich L3-tetraploiden Form, gleiche Vergrößerung, jeweils aus dem grünen Binnenfeld (siehe Abb. 39)

Aus 'Frank Headley' GWG/DTD konnte eine Variante GGW/DDT gewonnen werden (Abb. 32 und 42). In ihren Musterproportionen ist die Weißkernform mit den vermuteten L3-Varianten vergleichbar. Abbildung 42 verdeutlicht gleichzeitig den Phänotyp einer GGW-Variante auf diploider Ebene. Erste Sprossscheitellängsschnitte erlaubten es nicht, die cytochimärischen Konstitutionen von L2-Varianten eindeutig zu verifizieren. Dabei muss berücksichtigt werden, dass erst nach Abvermehrung der auffälligen Triebe ausreichend Material für eine fundierte Sprossscheitelanalyse zur Verfügung steht.



Abbildung 42 Laubblätter von 'Hills of Snow', vermutlich GWG/DDT (Mitte und Abb. 37+43), 'Frank Headley' GGW/DDT (links) und Sprossvariante 'Hills of Snow' GGW/DDD (siehe Abb. 12)

Im Gegensatz zu den nur aufwändig abvermehrbaaren L2-tetraploiden Varianten mit breitem hellen Rand kann den Schmalrandformen eine unproblematische gärtnerische Handhabung attestiert werden. Stecklinge von 4 der 5 Varianten ('Frank Headley GWG/DDT' ging verloren) stehen ab Frühjahr 2006 für vertiefende histologisch/cytologische Analysen zur Verfügung.

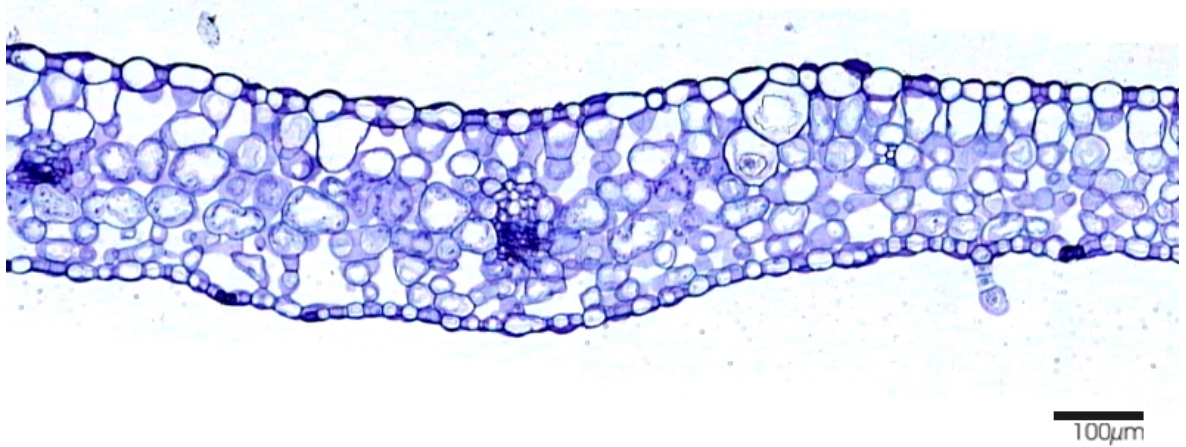


Abbildung 43 'Hills of Snow' GWG, vermutlich DDT; Übergang vom weißen Randbereich (rechts) ins grüne Binnenfeld. Chlorophyllführende Zellen sind deutlich größer als vergleichbar positionierte farblose Zellen

Aus Abbildung 40 geht hervor, dass sich die genetisch determinierte Zonierung der Sorte 'Contrast' in ihrer Position unabhängig von der histogenetischen Komposition des variegaten Blattes manifestiert. Aus gartenbaulicher Sicht ist mit der Reduzierung des Flächenanteils chlorophylldefekter Zellareale in diesem Fall ein ästhetischer Wertverlust verbunden. Die Schmalrandvariante aus 'Hills of Snow' stellt hinsichtlich ihres Laubblattmusters dagegen einen Typ dar, dessen züchterische Prüfung empfohlen werden kann.

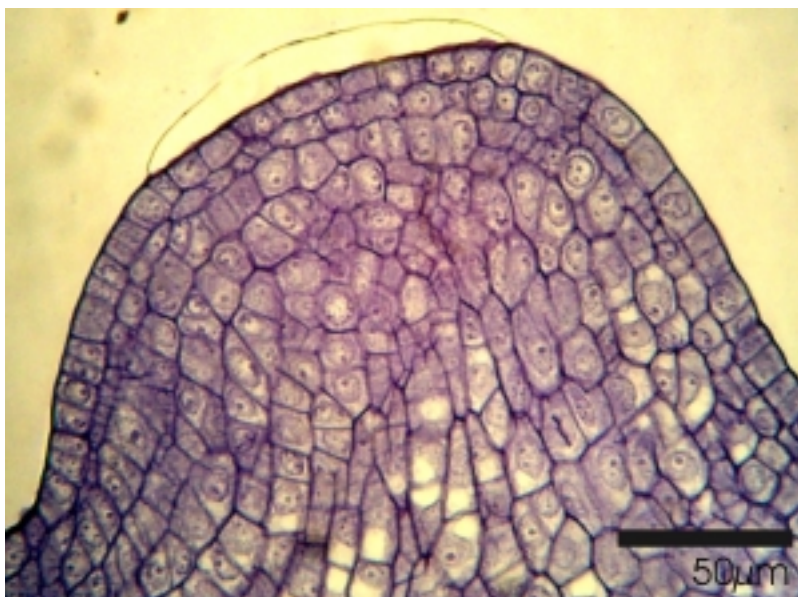


Abbildung 44 'Mrs Pollock' TDT , Sprossscheitellängsschnitt, L1 und L3 mit vergrößerten Zellkernen

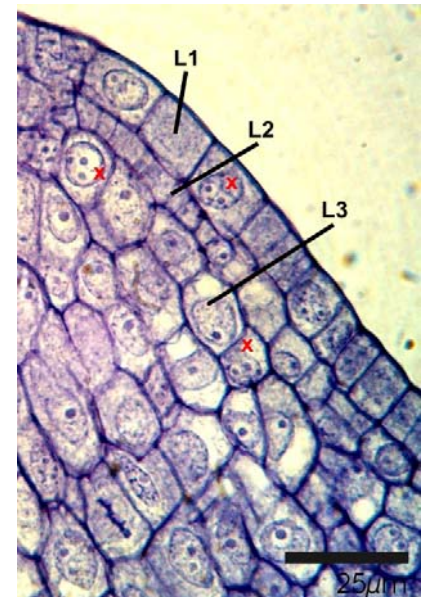


Abbildung 45 Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 44, Zellen mit zwei Nucleoli (x) liefern Hinweise auf eine Polyploidisierung (vergleiche: OLBRIGHT 1998)

3.3 Kreuzung polyploidisierter Weißrandformen auf tetraploider Stufe

Die reziproken Kreuzungsversuche der Jahre 2003 und 2004 dokumentiert Tabelle 20. Da einige der unter 3.2.1. beschriebenen L2-Varianten erst gegen Ende der Vegetationsperiode 2004 registriert wurden, konnten nicht alle vielversprechenden Typen mit dem bestehenden tetraploiden Sortiment kombiniert werden.

Tabelle 20 Ergebnisse reziproker Kreuzungen mit polyploidisierten L2-Varianten

Kreuzung (Sorte x Weißrandvariante 4x , reziprok)	ausgelegte Samen	grün	variegat		weiß	nicht gekeimt	unsteril
' Contrast 4x ' x ('Lauretta', 'Melocherry')	44	0	15	75%	5	24	0
'Lauretta' x ' Contrast 4x '	28	21	2	9%	0	5	0
'Melocherry' x ' Contrast 4x '	34	19	10	34%	0	5	0
' W. Langguth 4x ' x ('Lauretta', 'Melocherry')	79	31	43	58%	0	3	2
'Lauretta' x ' W. Langguth 4x '	23	20	0	0	0	1	2
'Melocherry' x ' W. Langguth 4x '	56	38	4	10%	0	13	1
' F. Headley 4x ' x ('Melocherry', 'Purpurball')	143	107	16	12%	6	12	2
'Melocherry' x ' F. Headley 4x '	56	49	2	4%	0	3	2
'Purpurball' x ' F. Headley 4x '	10	8	0	0	0	1	1
' F. of Spring 1 4x ' x ('P. Orange', 'Lauretta', 'Melocherry')	100	65	27	29%	1	1	6
'Lauretta' x ' F. of Spring 1 4x '	6	6	0	0	0	0	0
'Melocherry' x ' F. of Spring 1 4x '	15	14	1	7%	0	0	0
' F. of Spring 2 4x ' x ('P. Orange', 'Sabine', 'Robe')	53	26	26	49%	1	0	0
'Robe' x ' F. of Spring 2 4x '	61	50	1	2%	0	4	6
' Hills of Snow 4x ' x ('Melocherry', 'Juliane')	24	20	4	17%	0	0	0
'Melocherry' x ' Hills of Snow 4x '	15	14	1	7%	0	0	0

Alle getesteten Plasmotypen brachten in Kreuzungen mit aktuellen Sorten Samenansätze hervor. Mit der Kombination mehrerer grünlaubiger Pollenspender, das heißt mit der Verwendung von Pollengemischen, sollten potenzielle Sortenunverträglichkeiten minimiert werden. Die stark schwankende Zahl der geernteten und ausgelegten Samen erlaubt im Rahmen der vorliegenden

Untersuchungen keine Rückschlüsse auf die Fertilitätsverhältnisse des eingesetzten Materials. Auffallend ist jedoch mit über 50 % der Anteil nicht keimfähiger Samen in der Kreuzung mit 'Contrast 4x' als Mutterpflanze. Gleichzeitig ist diese Kombination die einzige, die keine grünen Nachkommenschaften hervorbrachte. Der Umfang der Kreuzungen war durch den Einsatz ausschließlich primär entstandener L2-Sprossvarianten limitiert. Statistisch aussagekräftige Kreuzungsanalysen sind erst nach Abvermehrung mutierter Triebe möglich. Bei nur zwei Ausnahmen wies das geerntete Saatgut eine *in vitro*-Keimfähigkeit von über 80 % auf, Verluste durch Kontaminationen erreichten in nur einem Fall knapp 10 % und waren sonst zu vernachlässigen.



Abbildung 46 Sämpling aus 'Contrast 4x' x Sorte mit lang haltendem Mischzustand



Abbildung 47 'F. of Spring 4x' x Sorte, Sämpling mit ungewöhnlich früher periklinalchimärischer Entmischung

Vier Kreuzungen brachten weiße Sämlinge hervor. In allen diesen Kreuzungen fungierten Weißrandformen als Mutterpflanzen. *In vitro* zeigten weiße Sämlinge im Keimblattstadium keine Wuchsanomalien. Die 13 chlorophylldefekten Pflänzchen fanden in Pfropfexperimenten Verwendung (3.7). Alle Versuche mit WR-Mutterpflanzen brachten in wechselnden Anteilen variegated Nachkommenschaften (12-75 %). Kombinationen grüner Mutterpflanzen mit variegated Pollenspendern brachten in 3 von 10 Fällen keine weißbunten Sämlinge. Ein Vergleich sämtlicher Kombinationen hinsichtlich der Kreuzungsrichtung mit dem höheren variegated Output fällt eindeutig aus: Variegated Formen bringen bei Verwendung als Mutterpflanzen jeweils prozentual mehr bunte Sämlinge. Vergleichbar mit den Zuständen auf diploider Ebene zeigen Nachkommen aus Kreuzungen mit 'Contrast 4x' ein lang anhaltendes Segregationsmuster (Abb. 46) während alle anderen tetraploiden Kombinationen nur einzelne farbmarkierte Sektoren hervorbrachten. Die in Abbildung 47 dokumentierte rasche Entstehung periklinalchimärischer Konstitutionen war die Ausnahme. Von den insgesamt 47 variegated Nachkommen aus Kreuzungen mit 'Wilhelm Langguth 4x' wurden 18 für Versuche zur Adventivsprossinduktion *in vitro* (3.8)

verwendet. Alle anderen variegaten Sämlinge wurden ins Gewächshaus überführt. Durch einen Kulturfehler bei der Freisetzung des sterilen Materials gingen 12 der 16 variegaten Nachkommen aus der Kreuzung 'Frank Headley 4x' x ('Melo cherry', 'Purpurball') durch Kontaminationen verloren. Im Verlauf der vegetativen Entwicklung der Jungpflanzen wurden ursprünglich vorhandene, weiße Zelldeszendenzen sehr häufig verdrängt, das heißt sie gelangten zunächst nicht in teilungsaktive Meristeme. Über teilweise drastische Rückschnitte wurden basale Austriebe provoziert mit dem Ziel, ruhende Lateralmeristeme bzw. Adventivsprosse zum Austrieb anzuregen. Die Zahl der aus den variegaten Sämlingen gewonnenen Varianten mit stabiler Etablierung plasmatisch weißer Zelldeszendenzen in Meristemen unterliegt der gärtnerischen Geschicklichkeit des Experimentators und trägt damit eine sehr individuelle Komponente. Bei Abschluss der Bonituren Ende 2005, das heißt ein gutes Jahr nach den Aussaaten, lagen insgesamt 26 Pflanzen mit periklinalchimärischem Laubblattmuster des Typs xWG vor (ohne Kreuzungen mit 'Contrast 4x') (Tab. 21, Abb. 48-51).

Tabelle 21 Entwicklung variegater, tetraploider Sämlinge zu WR-Formen

Kreuzung	getopft	WR	%
'W. Langguth 4x' x ('Lauretta', 'Melo cherry')	17	8	47
'Melo cherry' x 'W. Langguth 4x'	3	1 (Abb. 50)	33
'F. of Spring 4x' x ('P. Orange', 'Lauretta', 'Melo cherry')	14	9	64
'F. of Spring 4x' x ('P. Orange', 'Sabine', 'Robe')	15	7	47
'F. Headley 4x' x ('Melo cherry', 'Purpurball')	4	1	25
Gesamt	53	26	49

Aus den erfolgreich aklimatisierten variegaten Sämlingen konnten in knapp 50 % aller Fälle Weißrandvarianten gewonnen werden. Von den ursprünglich 27 variegaten Nachkommen aus Kreuzungen mit 'Contrast 4x' gelangten 18 ins Gewächshaus. Als sich abzeichnete, dass alle Varianten lang haltende Mischzustände repräsentieren und damit die Entstehung von WR-Typen gesichert war, blieben nur Belegexemplare aller Kombinationen erhalten. Die in Tabelle 21 zusammengefassten prozentualen Werte erlauben in Verbindung mit den Kreuzungsergebnissen aus Tabelle 20 eine grobe Abschätzung des praktisch notwendigen Züchtungsaufwandes für Kreuzungen mit periklinalchimärischen Plasmavarianten auf tetraploider Ebene. Bei der Verwendung von WR-Mutterpflanzen erlauben Kreuzungsvarianten mit nicht ausgesprochen lang anhaltendem Mischzustand die Bonitur von F1-Periklinalchimären in bis zu 28 % der erhaltenen Sämlinge ('W. Langguth', 'F. of Spring': 21 %, 'F. Headley': 3 %; Beurteilung ein gutes Jahr nach Sterilaussaat). Für Kreuzungen mit 'Contrast 4x' ergibt sich ein verwertbarer Output praktisch in Höhe der prozentual auftretenden variegaten Sämlinge (75%).

Aus der Kombination 'Hills of Snow 4x' x ('Melocherry', 'Juliane') konnten zwei WGG-Formen sowie ein WWW-Spross gewonnen werden. Letzterer steht -ernährt von grünem Ammengewebe- für Rückkreuzungen mit dem aktuellen Sortiment als plasmatisch weiße Variante zur Verfügung. Beide WGG-Formen zeigen ein ungewöhnliches Laubblattmuster (3.3.1). Die bislang einzige Sprossvariante GWG mit dem Plasmotyp aus 'Frank Headley' zeigt Abbildung 57 (zu ihrer Entstehung 3.3.1). Eine variegated, nicht periklinalchimärische Kreuzung mit 'W. Langguth 4x'



Abbildung 48 Zonierte Laubblattvariante aus einer Kreuzung mit 'W. Langguth 4x'

Pflanze aus der Kombination 'Contrast 4x' x ('Lauretta', 'Melocherry') wurde in reziproken Rückkreuzungen mit 'Melocherry' sowie 'Purpurball' verwendet. Aus zwei der drei Kreuzungsvarianten gingen variegated F2-Sämlinge hervor, die in ihrem Entmischungsverhalten den Vorergebnissen auf diploider und tetraploider Stufe glichen.



Abbildung 49 Kreuzung mit 'F. of Spring 4x', Blütencharakter der 4x-Hochleistungssorten in Kombination mit variegated Blattrand

Hinsichtlich gärtnerisch interessanter Merkmale (zu den Laubblattmustern speziell: 3.3.1) zeigen die entstandenen Weißrandvarianten die ganze Bandbreite eines Erbganges auf tetraploider Ebene. Nachkommen von 'Flower of Spring 4x', einer einfach blühenden Variante, zeigen nach Kreuzung mit modernen Sorten halb gefüllte Blüten (Abb. 49). Kombinationen der halb gefüllten 'W. Langguth 4x' mit dem aktuellen Sortiment bringen auch ungefüllte Formen hervor. Eine Weißrandpflanze aus 'W. Langguth 4x' x ('Lauretta', 'Melocherry') zeigt eine für weißbunte Pelargonien neue Blütenfarbe (Red-Purple-Group 57A, RHS Flower Colour Chart, Abb. 51). In der F1 derselben Kombination wurde eine Variante mit ausgeprägter Zonierung gefunden (Abb. 48). Der größte Teil der grünen Nachkommen wurde verworfen, einige Sämlinge aus Kreuzungen mit 'Wilhelm Langguth' blieben jedoch erhalten. Ungeschnitten erreichten sie im Verlauf einer Vegetationsperiode eine Höhe von 1,20m (!). Mitotisch nach grün entmischte

Seitensprosse an den periklinalchimärischen Varianten aus 'W. Langguth' zeigen bei isogener Konstitution ebenfalls ein überlegenes Wachstum. Die histogenetische Stabilität der gewonnenen xWG-Formen auf tetraploider Ebene ist (insbesondere vor diesem Hintergrund) erstaunlich. An abvermehrten WR-Varianten aus 'Flower of Spring' und 'W. Langguth' (ca. 40 Pflanzen) konnte über eine Vegetationsperiode hinweg nicht eine einzige Sprossvariation beobachtet werden.



Abbildung 50 Bislang einzige tetraploide Weißrand-variante ('Melo cherry' x 'W. Langguth 4x') mit grüner Mutter (WR aus 'Contrast 4x' unberücksichtigt)



Abbildung 51 Blütenfarbvariante (Red-Purple-Group 57A) aus einer Kreuzung mit 'W. Langguth 4x'

Neben den bereits an sich aussagekräftigen morphologischen Merkmalen der F1-Pflanzen konnte deren tetraploider Zustand über Stomatamessungen ('W. Langguth 4x' x Sorte, $\bar{x}=41,5\mu\text{m}$, $n=30$) sowie anhand von Wurzelspitzen-Quetschpräparaten (Abb. 52) zusätzlich verifiziert werden.

In Wurzelspitzenpräparaten ließen sich wiederholt mehr als 30 Chromosomen durch mikroskopisches Durchfokussieren auszählen. Die fotografische Dokumentation einer vollständigen Metaphasenplatte gelang jedoch nicht.

Erste Rückkreuzungen von F1-Pflanzen mit der Sorte 'Melo cherry' liefern keine Hinweise auf Fertilitätseinschränkungen des gewonnenen Materials. Variegated Nachkommen (F2) mit den Plasmotypen aus 'Contrast' und 'Hills of Snow' werden derzeit kultiviert.

Die Bewertung gartenbaulicher Eigenschaften der

primären Hybriden fällt ambivalent aus. Blütenmerkmale sowie der Sprossaufbau von tetraploiden

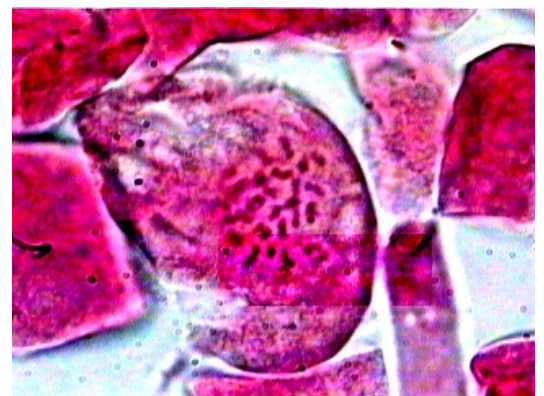


Abbildung 52 'F. of Spring 4x' x 'Sorte' Wurzelspitzenpräparat mit 30 zählbaren Chromosomen; ca. 1200x

WR-Typen aus 'W. Langguth' und 'F. of Spring' sind vielversprechend. Die Vermehrung beider Typen war problemlos möglich. Neben der nur mangelhaften vegetativen Leistung ist insbesondere die Anfälligkeit der breiten weißen Blattränder gegen Spritzwasser zu bemängeln.

3.3.1 Histogenese periklinalchimärischer Plasmavarianten auf tetraploider Ebene

Mit der Bonitur erster Weißrandformen aus biparentalen Kreuzungen offenbarten sich auf tetraploider Ebene markante histogenetische Phänomene. Hinsichtlich der Breite L2-bürtiger Blattränder unterscheiden sich sämtliche aus Kreuzungen hervorgegangene tetraploide Typen (zu den hybridvariegaten Varianten siehe 3.4) deutlich von vergleichbaren diploiden Formen. Alle beobachteten F1-Weißrandpflanzen besitzen, verglichen mit dem diploiden Ausgangsmaterial, überproportional breite Blattränder. In F1-Pflanzen einer Kreuzungskombination kann dabei eine Variation der Musterproportionen beobachtet werden (Abb. 53). GWx bzw. WGx-Formen zeichnen sich auf tetraploider Ebene durch die regelmäßig sichtbare Beteiligung von L1-Deszendenz am Aufbau des Laubblattes aus. Zwei aus Kreuzungen mit 'Hills of Snow 4x' hervorgegangene WGG-Typen zeigen identische Laubblattmuster (Abb. 54). GWx-Formen aus Kreuzungen mit 'F. of Spring 4x', und 'Contrast 4x' zeigen in unterschiedlich starkem Ausmaß die perikline Aufspaltung der Epidermis am Laubblattrand (Abb. 55). Für WR-Varianten aus 'W. Langguth 4x'-Kreuzungen konnten bislang keine chlorophyllführenden Stomatageleitzellen nachgewiesen werden.

Während alle aus Kreuzungen mit 'Contrast 4x' hervorgegangenen Typen vollständig ebene Blätter aufweisen, waren die Weißrandvarianten aus 'Wilhelm Langguth' und 'Flower of Spring' insbesondere Anfang des Jahres 2005 durch starke Aufwölbungen deformiert. In der Zeit wurde über verstärkte Düngungen versucht die Sprossentwicklung zu fördern. Gegen Ende der Vegetationsperiode waren die Verwerfungen weniger stark ausgeprägt, so dass hier offensichtlich ein Einfluss der Kulturführung deutlich wird.



Abbildung 53 Zwei WR-Varianten aus Kreuzungen mit 'Flower of Spring 4x' zeigen deutlich verschiedene Musterproportionen

Aus variegaten Sämlingen gingen im Untersuchungszeitraum mehrfach Triebe mit vollständig weißen Blättern hervor, deren Sprossachse jedoch einen leicht grünlichen Schimmer aufwies. Der Rückschnitt dieser Triebe mit dem Ziel, basisnahe Triebe unter Beteiligung residualer grüner Zell-



Abbildung 54 WGG-Form aus einer Kreuzung mit 'Hills of Snow 4x' mit regelmäßigen, markanten L1-Beteiligungen am Aufbau der Laubblätter



Abbildung 55 Blatt eines GWW-Sprosses aus 'F. of Spring 4x' x Sorte, L1-Beteiligungen sichtbar

deszendenz zu provozieren, offenbarte grüne Zellareale im Sprosszentrum (Abb. 56). Abbildung 57 dokumentiert den Austrieb einer xWG-Variante unterhalb einer solchen Schnittstelle an einer F1-Pflanze aus 'Frank Headley 4x' x Sorte. Aus Abbildung 47 werden Wechselwirkungen chlorophylldefekter Zellareale mit einer deutlich ausgeprägten Zonierung deutlich. Anders als in Kreuzungen mit 'Contrast 4x' (Abb. 46), in denen eine Zone auch in chlorophylldefekten Bereichen expremiert wird, ist hier ganz offensichtlich die Farbstoffsynthese an L3-bürtige, grüne Deszendenz gebunden.



Abbildung 56 Zurückgeschnittener Spross einer Variante aus 'Frank Headley 4x' x Sorte



Abbildung 57 Austrieb eines xWG-Sprosses an der Schnittstelle aus Abb. 56

3.4 Hybridvariegation

3.4.1 Kreuzung von *Pelargonium zonale* 4x mit aktuellen Sorten

Die gepoolten Ergebnisse der Kreuzungen mit *Pelargonium zonale* auf tetraploider Ebene zeigt Tabelle 22. An den je zehn Mutterpflanzen ließen sich über die gesamte Vegetationsperiode des Jahres 2002 zusammen 216 Samen ernten. Im Anschluss an die Keimung gingen ca. 40 % des Materials vor dem Erreichen des Boniturstadiums (zweites entwickeltes Laubblatt) zugrunde. Die höchsten Samenansätze brachten Kombinationen mit 'Penve', 'Shocking Pink' sowie 'Robe'. Variegata Nachkommenschaften gingen insbesondere aus Kreuzungen mit 'Juliane' hervor (insgesamt 5) (Abb. 58). Aus 11 variegaten Sämlingen konnten 2 periklinalchimärische Chlorophyllvarianten der Konstitution GWG gewonnen werden, die sich seit ihrer Entstehung im Jahr 2001 stabil erhalten lassen. In Abhängigkeit von Umweltfaktoren ist die Intensität des Farbkontrastes im Jahresverlauf allerdings schwankend (Abb. 59). Habitus und Blütenmerkmale der entstandenen Hybriden tragen den zu erwartenden Wildartcharakter

Tabelle 22 Kreuzungen mit der tetraploiden Form aus *Pelargonium zonale*

		geerntete Samen	ausgelegte Samen	Sämlinge	bonitiert	grün	hellgrün	variegat
'Sorte'	P. zonale 4x	140	121	87	44	4	37	3
P. zonale 4x	'Sorte'	76	76	40	30	21	1	8



Abbildung 58 Sämlinge aus der Kreuzung *P. zonale* 4x x 'Juliane' mit sektorialen Variegationen



Abbildung 59 Laubblatt einer aus *P. zonale* 4x x 'Juliane' gewonnenen Periklinalchimäre

Auffallend ist die mit der Kreuzungsrichtung variierende Zusammensetzung der Nachkommenschaften. Kumulativ betrachtet ergeben sich die in Abbildung 60 gezeigten prozentualen Verteilungen. Es wird deutlich, dass chlorophylldefekte Pflanzen (variegat und hellgrüne) überwiegend aus der Kombination 'Sorte' x Art hervorgehen. Dagegen sind homohistisch hellgrüne Kreuzungsprodukte in der Kreuzungsrichtung Art x 'Sorte' offensichtlich sehr selten. Eine Kontingenztafelanalyse (BORTZ 2000) mit abschließendem χ^2 -Test belegt die signifikant ungleiche „Aufspaltung“ der Nachkommenschaften.

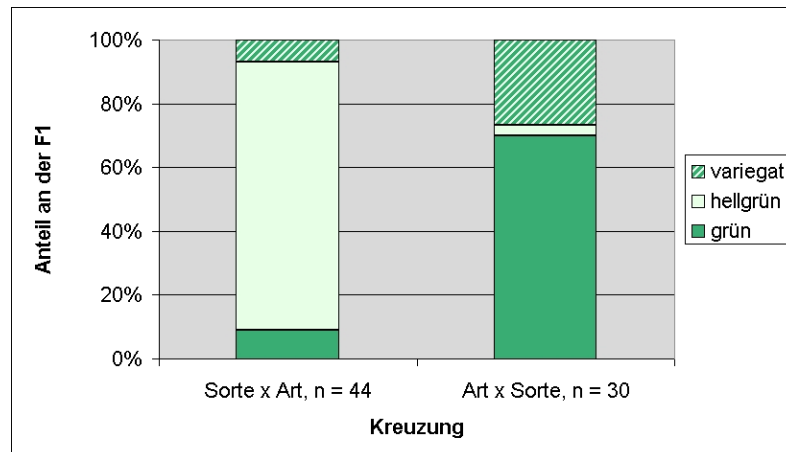


Abbildung 60 Prozentuale Anteile hybridvariegater Sämlinge in Abhängigkeit von der Kreuzungsrichtung

Die sektorale Ausprägung der beobachteten Variegationen sowie die Entstehung periklinal-chimärischer Varianten gelten als Indizien für Segregationsprozesse nach biparentalen Erbgängen. Es liegen somit Hybridvariegationen auf tetraploider Ebene vor, die sich über die Kreuzung der normal grünen Ausgangsklone induzieren ließen.

3.4.2 Kreuzungen aktueller Sorten mit hybridvariegatem Ausgangsmaterial

Mit der aus Dresden bezogenen hybridvariegaten Laubblattvariante wurden im Jahr 2003 reziproke Kreuzungen mit aktuellen, tetraploiden Sorten durchgeführt (Tab. 23).

Tabelle 23 Kreuzungen mit einer hybridvariegaten, tetraploiden Variante

		geerntete Samen	ausgelegte Samen	Sämlinge	bonitiert	grün	weiß	variegat
Hybride	'Sabine', 'P. Orange', 'Melo cherry'	39	39	27	27	23	0	4
'Sabine'	Hybride	25	25	17	17	17	0	0
'Melo cherry'	Hybride	1	1	1	1	1	0	0

Von den 4 variegaten Sämlingen konnten 3 zur Entwicklung periklinalchimärischer Strukturen angeregt werden. Die Weißrandvarianten unterscheiden sich deutlich von der Ausgangsform hinsichtlich der Stabilität ihrer Chlorophylldefekte. Während die ursprüngliche Hybride insbesondere in den Wintermonaten stark ergrünt, erweisen sich die Laubblattmuster nach der Kreuzung mit aktuellen Sorten als photostabil (Abb. 61 und 62). In frühen Entwicklungsstadien stark ausgeprägte, offenbar histogenetisch bedingte Aufwölbungen der Blattspreiten normalisierten sich im Entwicklungsverlauf. Weißrandvarianten konnten abvermehrt werden, ihre periklinalchimärische Konstitution blieb im Beobachtungszeitraum stabil erhalten.



Abbildung 61 Sämling mit hybridvariegatem WR-Muster



Abbildung 62 WR-Blätter der hybridvariegaten Ausgangsform (links) und einer nach Kreuzung mit tetraploiden Sorten hervorgegangenen Variante, Winteraspekt

Blütenmorphologisch zeigen zwei der drei Nachkommen ein für die Gattung *Pelargonium* untypisches Verzweigungsmuster. An der Basis eines primären Blütenbüschels verzweigt sich die Blütenstandsachse regelmäßig und übergipfelt mit 5 ausladenden Seitentrieben die ursprünglichen Infloreszenzen. An den Spitzen der Seitentriebe entwickeln sich jeweils Einzelblütenstände, so dass eine sehr lockere Doppel(trug)dolde gebildet wird.

Aus ersten Rückkreuzungen der entstandenen Weißrandvarianten gingen insgesamt 101 Samen hervor. Die Bonitur von 77 steril gekeimten Sämlingen brachte in der eigenen F2 nur zwei variegata Nachkommen, aus denen jedoch keine stabilen Varianten gewonnen werden konnten.

3.5 TDZ-Gießversuch

Die Gießversuche im Gewächshaus blieben erfolglos. Nur an einer behandelten Pflanze konnte in unmittelbarer Nähe der Schnittstelle ein neuer grüner Austrieb beobachtet werden. An den benetzten Wurzelhälsen waren keine Anzeichen von adventiven Neubildungen zu erkennen. Vier Wochen nach Abschluss der Behandlungen wurden die Wurzelsysteme der Versuchspflanzen freigespült und bonitiert. Dabei ließen sich keine morphologischen Auffälligkeiten feststellen.

3.6 Antibiotikabehandlungen

Alle getesteten Applikationsvarianten lieferten vergleichbare Ergebnisse. Aus behandelten Knospen austreibende Sprosse waren zunächst rein weiß (Abb. 63 und 64). Der Bleicheffekt der Wirkstoffe erstreckt sich auch auf ausdifferenzierte Sprossabschnitte, die mit den Arbeitslösungen versehentlich in Berührung kamen. Im Verlauf der Vegetationsperiode wiederergrünen weiße Sprosse zunächst in den Interkostalfeldern. Jüngste Sprossabschnitte oberhalb der ursprünglichen Behandlungsebene zeigten am Ende der Vegetationszeit keine morphologischen Auffälligkeiten. Im Frühjahr des Folgejahres waren behandelte Pflanzen von unbehandelten Vergleichspflanzen hinsichtlich ihrer Laubblattmerkmale nicht zu unterscheiden.



Abbildung 63 Weißer Austrieb an der Sorte 'Lauretta' im Anschluss an eine Spectinomycinbehandlung (100 mg/ml)



Abbildung 64 Weißer Blütrieb der Sorte 'Robe', der in Kreuzungen verwendet wurde

Die im dritten Versuchszeitraum gewählte Wirkstoffkonzentration von 150 mg/ml führte in einigen Fällen zu Austriebsverzögerungen gepaart mit Verbraunungen. Das vollständige Absterben behandelter Knospen wurde in Einzelfällen zunächst vermutet, jedoch konnten an der Mehrzahl der verbrauchten Knospen einige Wochen nach der Behandlung ebenfalls weiße Austriebe beobachtet werden.

Chlorophylldefekte Sprosse kamen im Vegetationsverlauf zur Blüte. Im Gegensatz zu den chlorophyllführenden Sprosstteilen waren bei der Petalenfärbung keine Auswirkungen der Antibiotikabehandlungen zu verzeichnen. Die auch morphologisch unauffälligen Blüten wurden im Jahr 2002 in reziproken Kreuzungen mit chlorophyllintakten Sorten verwendet. Alle entstandenen Sämlinge (24 aus g x w und 18 aus w x g) waren grün.

3.7 Versuche zur somatischen Kombination

Aus Kreuzungen auf tetraploider Ebene standen insgesamt 13 Sämlinge ohne erkennbaren Grünanteil zur Verfügung, die in Pfropfungen verwendet wurden (Abb. 65). In keinem Fall konnte die dauerhafte Verwachsung der Pfropfpartner beobachtet werden. An beiden Schnittstellen bildeten sich jeweils kallöse Abschlussgewebe, die jedoch unabhängig voneinander blieben. Die weißen Sprosse blieben unterschiedlich lange turgeszent. Insbesondere sehr junge Sämlings-explantate erschienen über Wochen unverändert, trieben allerdings auch nicht weiter aus.



Abbildung 65 Weißer Sämling aus 'F. Headley 4x' x Sorte

3.8 Adventivsprossinduktion *in vitro*

An allen 54 Explantaten (18 variegated, sterile Sämlinge aus 'W. Langguth 4x' x Sorte, jeweils in 3 Teile zerlegt) wurde die Bildung zahlreicher Sprosse beobachtet (Abb. 66-68). Sprossspitzenpräparate wiesen zunächst eine deutliche Polarität auf, insbesondere am apikalen Ende entwickelten sich dichte Sprossbüschel. In 4 Fällen besaßen derartige Präparate einen übergreifenden sektorialen Charakter (Abb. 67). An den Farbgrößen inserierte Einzelsprosse waren variegat. Aus mittleren sowie basalen Hypokotylsegmenten gingen überwiegend grüne Adventivsprosse hervor.

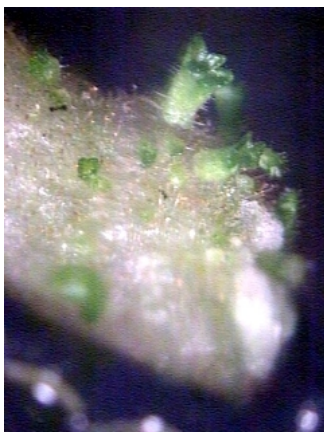


Abbildung 66 Hypokotylmittelsegment mit Adventivsprossen (ca. 12x)

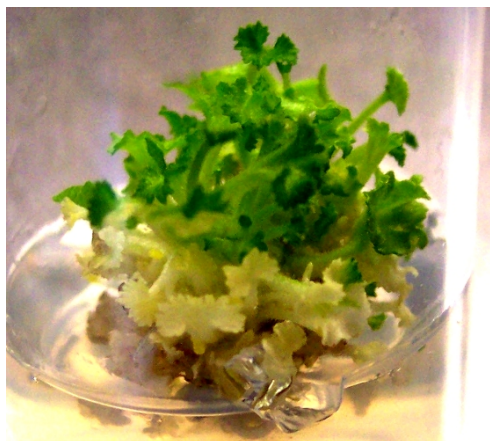


Abbildung 67 Sämlingsspitzen-explantat mit übergreifender Sektorbildung



Abbildung 68 Weiße und grüne Adventivsprosse an einem Mittelsegment

An 6 Präparaten waren auch weiße Sprosse erkennbar (Abb. 68). Alle Kulturen mit weißen Gewebekomponenten wurden auf IES (1 mg/l)-haltiges Bewurzelungsmedium in 200 ml Erlenmeyerkolben überführt. Die Präparate bildeten Wurzeln, jedoch gingen weiße Sprosse bis auf einen Fall verloren. Es muss darauf hingewiesen werden, dass im Kulturverlauf auf jede „gärtnerische“ Beeinflussung weißgrüner Sprossbüschel verzichtet wurde. Eine Pflanze mit

weißem Seitenspross konnte erfolgreich akklimatisiert werden.

3.9 *Pelargonium*-Zellsuspensionen

Die Entwicklung der sedimentierten Zellvolumina beider Kallussuspensionen zeigt zunächst einen deutlich erkennbaren sigmoiden Verlauf. In den ersten 6 Tagen nach Subkultur ist eine lag-Phase auszumachen gefolgt von einer ca. 8 bis 10-tägigen ausgeprägten Wachstumsperiode.

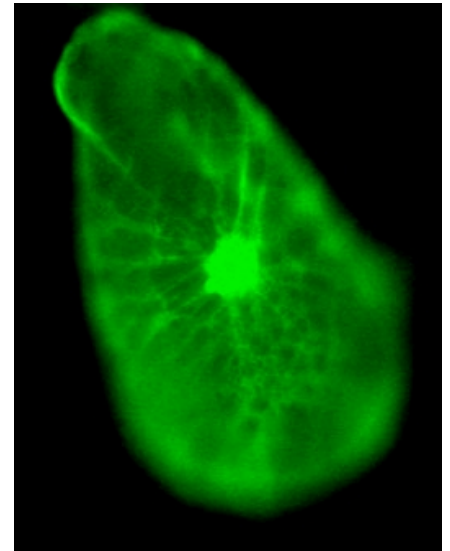
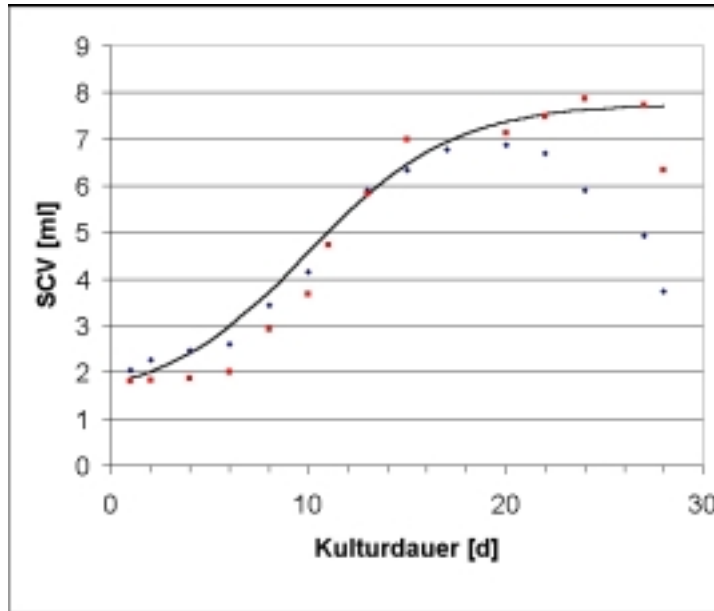


Abbildung 69 Entwicklung des SCV von Zellsuspensionen aus 'Viktoria' (blau) und 'Perlenkette Orange' (je 10ml Probenvolumen), im Vergleich eine log(3)-Wachstumskurve

Abbildung 70 Zelle aus einer 'Viktoria'-Kallussuspension, FDA-Färbung

Danach schwächt sich der Volumenzuwachs ab. Zwischen dem 20. und dem 24. Tag erreichen die Kulturen ein Volumenmaximum. Das abschließende Verfallsstadium wird von der typischen log(3)-Wachstumskurve nicht mehr abgebildet (Abb. 69).

Trockenmassebestimmungen erbrachten für beide Sorten den stärksten Zuwachs zwischen dem 10. und 19. Tag (Abb. 71). Insbesondere am Ende der Subkulturzyklen sowie in überständigen Kulturen wurden Zellen mit auffälligen flügelartigen Auswüchsen beobachtet, die sich von normalen Zellen (Abb. 70) deutlich unterscheiden. Neben Einzelzellen lagen in allen Kulturen Zellcluster vor. Erst im Untersuchungsverlauf wurde klar, dass die vollständige

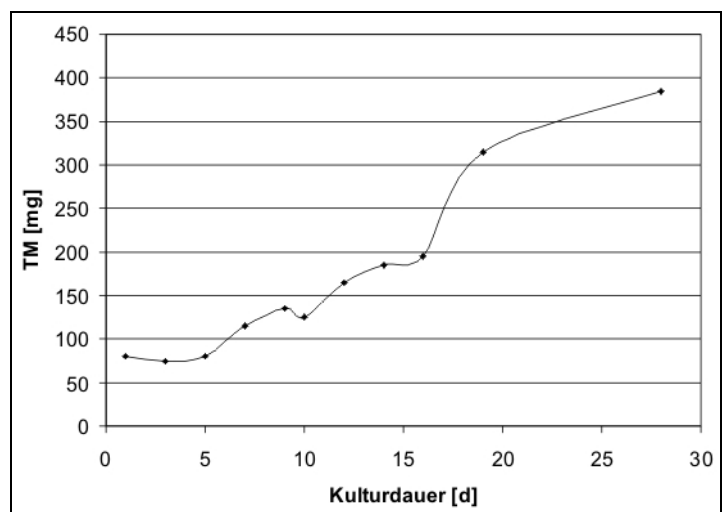


Abbildung 71 Entwicklung der Trockenmasse von *Pelargonium*-Zellsuspensionen, gemittelte Werte

Verdunkelung der Kulturen zu deutlich kleineren Zellen bei uneingeschränkter Teilungsaktivität führt. Da kleineren Zellen eine höhere mechanische Widerstandsfähigkeit im Verlauf der Protoplastenaufreinigung zugeschrieben werden kann, erfolgte die Umstellung auf vollständig lichtfreie Linien.

Bakterielle Kontaminationen mussten bei der antibiotikafreien Kulturführung in Kauf genommen werden. Der Ausschluss infizierter Chargen vor der Subkultur erlaubte es jedoch in Verbindung mit dem Aufbau zeitversetzter Linien jederzeit pathogenfreies, teilungsaktives Material für enzymatische Verdauungen zur Verfügung zu stellen.

3.10 Protoplastenkultur

Die Ergebnisse der enzymatischen Verdauungen waren stark schwankend. In Anlehnung an SCHUM et al. (2001) wurde versucht einen Zusammenhang zwischen dem Präparationszeitpunkt nach Subkultur und der Protoplastenausbeute auszumachen. Eine derartige Beziehung ließ sich jedoch auch bei exakter Taktung von Subkultur und Probenentnahme nicht konstruieren, womit ein zielgerichtetes Vorgehen zur Etablierung eines Regenerationssystems erschwert wurde. Verdauungserfolge ließen sich bereits vor Aufreinigung der Präparationen abschätzen. Ein experimenteller Einfluss des Reinigungsverfahrens auf die Versuchsverläufe kann damit ausgeschlossen werden.



Abbildung 72 Protoplasten aus einer 'Viktoria'-Kallussuspension im Anschluss an eine gelungene Präparation

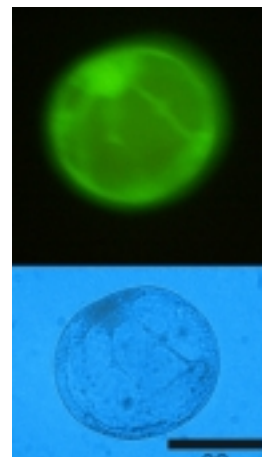


Abbildung 73 FDA-gefärbter 'Viktoria'-Protoplast mit (oben) und ohne Anregung

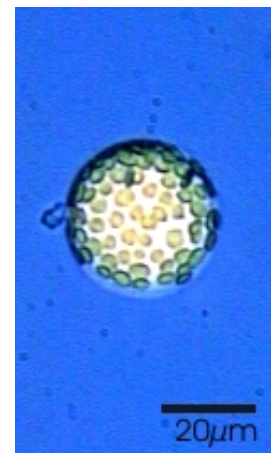


Abbildung 74 intakter Protoplast aus 'Lauretta'-Selbstung (Evans-Blau-Färbung)

Zellzählungen nach durchschnittlichen Versuchsverläufen ergaben in etwa 65000 Protoplasten/ml Präparation, misslungene Versuche brachten praktisch keine verwertbaren Zellen. Abbildung 72 zeigt eine gelungene Präparation aus einer 'Viktoria'-Kallussuspension. Einen Hinweis auf die Ursachen für die extremen Schwankungen lieferten Konsistenz und Farbe des Filterkuchens im Anschluss an die Probenentnahme. Leicht körnige, rein weiße Rückstände lieferten ausnahmslos brauchbare Verdauungsergebnisse, die Weiterverarbeitung gelblicher Filterkuchen brachte hingegen unbrauchbare Resultate. Die Markierung und bevorzugte Subkultur erfolgreich verdauter Suspensionen erlaubte es nicht, den geeigneten, offenbar physiologischen Zustand des

Ausgangsmaterials zu fixieren. Farblich waren vielversprechende Kulturen vor der Filtration nicht von ungeeigneten zu unterscheiden. Präparationen der Sorte 'Viktoria' brachten im Vergleich zu 'Perlenkette Orange' anfangs bessere Erfolge, so dass diese Sorte im Untersuchungszeitraum überwiegend verwendet wurde.

Im Anschluss an gelungene Präparationen erbrachten die beiden eingesetzten Nachweisverfahren Belege für die Vitalität isolierter Zellen (Abb. 73 und 74). Dabei lieferten die Färbetechniken gegenüber einer morphologischen Bonitur keine zusätzlichen Erkenntnisse. Runde, turgeszente Zellen erwiesen sich jeweils als vital.

Aus der 'Lauretta'-Selbstung standen nur 50 Samen für enzymatische Verdauungen zur Verfügung. Erfolgreich isolierte Kotyledonenprotoplasten (Abb. 74) ließen sich jedoch nicht zur Regeneration bringen.

Die Experimente zur Etablierung eines Regenerationssystems für *Pelargonium*-Protoplasten aus Kallussuspensionskulturen waren als Tastversuche angelegt. Die unetstetige Produktion aufgereinigter Protoplasten machte parallele Vergleichsansätze nahezu unmöglich. Häufig befanden sich in den Präparationen insgesamt nicht genügend Zellen um die angestrebte Kulturdichte von ca. 30000 Protoplasten/ml zu realisieren. In allen angesetzten Flüssigkulturen waren im Anschluss an die enzymatischen Verdauungen Zell-Zusammenlagerungen zu beobachten, die die Beurteilung von Zellteilungsprozessen erschwerten. FDA-Färbungen wiesen regelmäßig enzymatische Aktivitäten in derartigen Zellhaufen 14 Tage nach der Präparation nach. Die Überführung teilungsaktiven Materials auf ein Festmedium gelang jedoch nur in einem Einzelfall. Die Abbildungen 75 bis 77 dokumentieren die Regeneration von Kallus nach einer Protoplastenphase.



Abbildung 75 Zellkolonie 9 Tage nach der Präparation

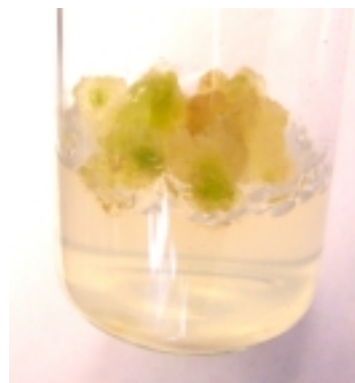


Abbildung 76 „Green Nodules“ auf einem TDZ-haltigem Medium

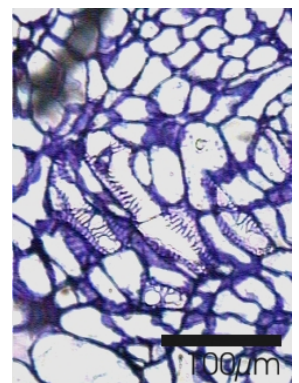


Abbildung 77 Gefäßdifferenzierungen in „Green Nodules“, Dünnschnittpräparat

Aus einer effektiven Verdauung konnte Mitte Februar 2004 1 ml einer sehr dichten und sauberen Protoplastenpräparation gewonnen werden. Verdünnt wurde mit dem Protoplastenmedium aus Tabelle 9 auf insgesamt 6 ml. Nach einer Woche waren an der Oberfläche der Kultur Zellteilungen deutlich auszumachen, so dass die Mediumzufuhr erst 7 Tage später erfolgte (2x3 ml +2x2 ml ½ MS/B5, flüssig, 0,88 mg/l TDZ). Abweichend von dem sonst verfolgten Protokoll wurden die sich rege teilenden Präparationen erst eine Woche später mit je 1 ml Medium (wie zuvor) verdünnt. In

der Folgewoche wurde auf vier Petrischalen aufgeteilt und mit je 1 ml Medium angereichert. Im April erfolgte eine Überführung in das für Suspensionskulturen verwendete Medium (wöchentlich +1 ml). 12 Wochen nach der Präparation wurden die dichten Zellsuspensionen tropfenweise auf feste Nährmedien aufgetragen ($\frac{1}{2}$ MS/B5, 0,44 mg/l TDZ und 0,88 mg/l TDZ). Eine Sprossregeneration aus den sich entwickelnden Kallussen konnte in den Folgemonaten nicht erreicht werden. Die Abbildungen 76 und 77 dokumentieren „Green Nodules“ wie sie auf den TDZ-haltigen Nährmedien beobachtet werden konnten. Mikrotomdünnschnitte verdeutlichen erste Anzeichen einer beginnenden Differenzierung in den ergrüntem Gewebebereichen. Die rundlichen Bezirke mit vergleichsweise kleinen Zellen zeigen in ihren Zentren jeweils Zellwandverfestigungen, wie sie für Leitgefäße bekannt sind.

3.11 Bonitur NMH-behandelter Versuchspflanzen

Aus der Behandlung von >25000 Samen diploider und tetraploider Herkunft wurden insgesamt 30 vorselektionierte Typen in Berlin weiter beobachtet. Im Untersuchungszeitraum gelang es nicht Chlorophyllvarianten zu etablieren, die hinsichtlich ihrer Laubblattmerkmale heute gehandelten Weißrandformen nahe kommen. Die zwei interessantesten periklinalchimärischen Varianten mit allerdings photosensiblen Blattrand (Abb. 78 und 79) fanden in Kreuzungen auf diploider bzw. tetraploider Ebene Verwendung, erwiesen sich jedoch als steril. Die extranukleäre Natur der induzierten Chlorophylldefekte konnte demnach nicht verifiziert werden.



Abbildung 78 Diploide Variante (2 mMol/5 h) mit photosensiblen weißen Rand



Abbildung 79 Tetraploide Behandlungsvariante (20 mMol/5 h) mit chlorophylldefekter L2

Auf tetraploider Ebene zeigt die vorliegende NMH-Weißrandvariante auffällige Blattmusterproportionen, wie sie aus den Kreuzungsexperimenten bereits bekannt sind. Das dunkelgrüne Binnenfeld bleibt nicht selten auf Areale in unmittelbarer Nähe zum Blattstielansatz beschränkt.

An zwei NMH-Varianten lassen sich drei Jahre nach der Behandlung Laubblattscheckungen unterschiedlicher Intensität ausmachen. Der variegated Spross einer tetraploiden Mutante zeigt eine Scheckung, die sehr deutlich an Deszendenzmuster, wie sie nach biparentalen Erbgängen

beobachtet wurden, erinnert (Abb. 82). Es gelang bisher jedoch nicht eine periklinalchimärische Sprossvariante zu selektieren. Auf diploider Ebene konnte eine Mutante mit einer sehr feinen Sprengelung ausgelesen und abvermehrt werden. An dem Klon konnten im Beobachtungszeitraum vereinzelt einheitlich grüne und weiße Laubblattsektoren ausgemacht werden. Die Etablierung einer offenbar einheitlich grünen Deszendenz in der L3 zeigt Abbildung 80. Die Besetzung L2-bürtiger Laubblattareale durch weiße Zellen verdeutlicht Abbildung 81.



Abbildung 80 Diploide Behandlungsvariante (2 mMol/1h) mit geschecktem Blattrand. Das L3-bürtige Binnenfeld erscheint einfarbig.

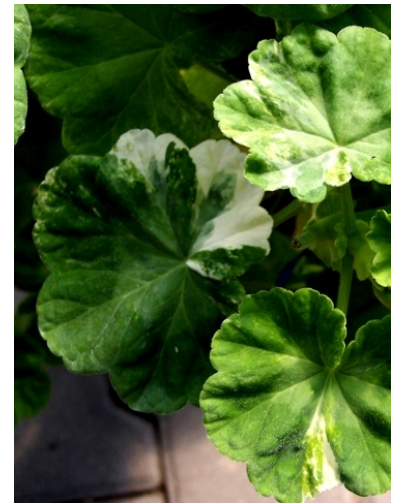


Abbildung 81 Pflanze aus Abb. 78 mit WR-Bildung

Aus den Mutationsexperimenten ging darüber hinaus eine ganze Reihe von Mutanten hervor, deren Laubblattvariegationen Parallelen zu bekannten periklinalchimärischen Varianten erkennen ließen. Insbesondere stabile Formen mit atypischen Gewebekonstellationen, möglicherweise in Folge von Wuchsdepressionen einzelner Scheitelschichten, konnten für histogenetische Untersuchungen bereitgestellt werden (Abb. 83).



Abbildung 82 Variegates Laub an einer tetraploiden Behandlungsvariante (20 mMol/5h, links) und Segregationsmuster einer diploiden Kreuzung



Abbildung 83 NMH-Behandlungsvariante mit massiver „Ohren“-Bildung. Ein Objekt für histologische Folgeuntersuchungen.

4 Diskussion

Bei einem geschätzten Anteil von annähernd 3 % (LOLIES 2002) aller gehandelten Pelargonien übersteigt die Zahl der in Deutschland verkauften blattvariegaten Pflanzen die Grenze von 5 Millionen. Unter Berücksichtigung der für Sonderformen erzielbaren höheren Preise darf von einem Einzelhandelsumsatz im zweistelligen Millionenbereich ausgegangen werden. Die Anpassung blattvariegater Typen an das moderne Hochleistungssortiment bzw. die Modifikation aktueller Sorten mit dem Zusatzmerkmal „Blattrandmusterung“ erlaubt mit einiger Sicherheit die Ausweitung dieses Segments, so dass der Züchtung von *Pelargonium*-Laubblattvarianten eine nicht unbedeutende wirtschaftliche Komponente eingeräumt werden darf. Neben der Aussicht, die phänotypisch recht dichten Standardsortimente markant zu erweitern, liefert das im Rahmen der vorliegenden Untersuchung geschaffene variegate Basismaterial vielfältige Ansatzpunkte für vertiefende histologisch/genetische Untersuchungen. Knapp 100 Jahre nach ERWIN BAURs grundlegenden Untersuchungen (BAUR 1909) bewähren sich periklinalchimärische *Pelargonium*-Varianten als vielschichtige Versuchsobjekte.

4.1 Zuchtziel „tetraploide Stufe“

Die Überlegenheit tetraploider *Pelargonium*-Hybriden gegenüber ihren diploiden Vorläufern lässt sich unmittelbar aus ihrer marktbeherrschenden Stellung ableiten. Selbst für das Marktsegment samenvermehrbarer Sorten bzw. F1-Hybriden, in dem bis heute diploides Material weitgehend vorherrscht, wurden in den zurückliegenden Jahrzehnten fortlaufend Untersuchungen mit dem Ziel der Etablierung tetraploider Varianten durchgeführt. Sie mündeten bereits in den 80er Jahren in der Entwicklung erster tetraploider F1-Hybriden in Dresden (pac® Elsner Jungpflanzen). Der internationale Durchbruch gelang jedoch erst 1991 mit der Einführung der tetraploiden Sorte 'Freckles', die auf Anhieb als „All-America Selections®“-Sieger gekürt wurde (PanAmerican Seed Company 1991).

Nach BADR und HORN (1971b) lässt sich die „Frage nach den Ursachen für die unbewusste Auslese der polyploiden *P. x zonale*-Hybriden [...] nicht eindeutig beantworten“. Neben einem Dosiseffekt, der sich aus der Verdopplung der genetischen Information im Zellkern ergibt, ist insbesondere das Ausmaß an Heterozygotie, das über die Kombination von bis zu 4 Allelen erreicht werden kann, ausschlaggebend für den Leistungszuwachs. Der Vergleich experimentell polyploidisierter Pflanzen mit ihren Ausgangsformen erlaubt eine Annäherung an den Einfluss der in der Zelle vorhandenen Chromosomenkopien auf gartenbaulich interessante Parameter. Hinsichtlich der Blütengröße ließen sich für *Pelargonium x zonale* in der Vergangenheit deutliche Korrelationen nachweisen, die ausgehend von homohistisch haploiden Klonen Petalenvergrößerungen in abgeleiteten diploiden und tetraploiden Versuchspflanzen nachwiesen. Ebenso erwiesen sich Laubblattgröße und Wüchsigkeit regelmäßig als mit der Ploidiestufe positiv korreliert (PLASCHIL et al. 2003, RÖSSEL 1990, POHLHEIM und RÖSSEL 1989, CLIFFORD 1970). Die im Rahmen dieser Untersuchung durchgeführten Petalenmessungen untersetzen die Erkenntnisse vorheriger Untersuchungen.

Dosisproportionale Wirkungen einzelner Allele werden von BADR und HORN (1971a) für

abgestufte Farbintensitäten im tetraploiden *Pelargonium*-Sortiment verantwortlich gemacht. Für *Pelargonium x zonale* werden daneben verkürzte Blütenstiele bei längerer Blühdauer sowie bessere vegetative Regenerationseigenschaften als züchterischer Vorteil auf tetraploider Ebene angegeben (BADR und HORN 1971b). Für das Merkmal Botrytis-Resistenz konnten UCHNEAT et al. (1999) in einem kumulativen Vergleich diploider und tetraploider *Pelargonium*-Sorten (*P. x zonale* und *P. x peltatum*) Vorteile auf der Seite der diploiden Klone feststellen. GRAZZINI et al. (1995) weisen in Untersuchungen zur Insektenresistenz die Kombination mehrerer verschiedener anarcadischer Säuren ausschließlich in tetraploiden Klonen nach, woraus sich theoretisch ein höheres Widerstandspotenzial ableiten lässt. PHILIPPI (1961) untersuchte die Fertilitätsverhältnisse diploider und tetraploider *Pelargonium*-Klone. Während sich Pollen der diploiden Testvariante 'Meteor' als zu über 90 % vital erwies war der Anteil lebensfähiger Pollenkörner bei tetraploiden Klonen auf 25 bis maximal 65 % reduziert. Die eingeschränkte Fertilität tetraploider Typen hat für die in der Praxis vegetativ vermehrten Klonsorten eher Vorteile. Bestäubte Blüten diploider Testpflanzen verlieren ihre Petalen wenige Stunden nach dem Eindringen der Pollenschläuche in das Narbengewebe (CLARK et al. 1997). Weniger fertile Pollen reduzieren möglicherweise die Zahl bestäubter Blüten resultierend in einer Ausweitung der Blütezeit. Seitens der züchterischen Praxis wird das Merkmal „Selbstputzvermögen“, das heißt das vollständige Ablösen verblühter Petalen von der Pflanze unabhängig von einer Befruchtung, eher mit tetraploiden Sorten positiv korreliert (pac® Elsner Jungpflanzen, persönliche Kommunikation).

Im Verlauf der vorliegenden Untersuchung geschaffene, periklinalchimärische Chlorophyllvarianten wiesen auf tetraploider Ebene Musterproportionen auf, die auf diploider Stufe keine Entsprechung finden. Es zeichnet sich ab, dass, offenbar unabhängig von der Entstehung der Blattrandvarianten, histogenetische Prozesse eng mit dem Ploidiegrad der Versuchspflanzen gekoppelt sind (4.3). Die Existenz der tetraploiden Sorte 'Melosilver' zeigt jedoch, dass Variationen in der Gewebekomposition prinzipiell möglich sind.

Die Polyploidisierung weißbunter *Pelargonium x zonale*-Hybriden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zielte nicht in erster Linie auf den primären Leistungszuwachs (partiell) valenzerhöhter Typen (4.7). Im Vordergrund stand die Kombinationsfähigkeit L2-tetraploider Weißrandvarianten mit dem in den vergangenen 50 Jahren entwickelten Hochleistungssortiment (4.2). Abgesehen von den unvorhergesehenen Musterproportionen liefern bereits die ersten Kreuzungsprodukte hinsichtlich ihrer Blüteneigenschaften Indizien für eine phänotypische Annäherung an das moderne Sortiment.

Tetraploide Arten-Abkömmlinge erwiesen sich in der Vergangenheit als vielversprechende Kandidaten für interspezifische Kreuzungen. Kombinationen genetisch redundanter Ausgangsformen brachten mitunter fertile Nachkommenschaften (*P. abrotanifolium* (4x) x *P. sidoides* (4x), HORN 1994). CHITTENDEN (1927) erwähnt eine sterile Kreuzung von *P. floribunda* und *P. verticillata*, die spontan einen fruchtbaren, tetraploiden Trieb hervorbrachte. Das im Rahmen der Studie erarbeitete, effektive Polyploidisierungsverfahren (4.7) sollte auf verwandte *Pelargonium*-Arten übertragbar sein und damit die interspezifischen Kombinationsmöglichkeiten erweitern. Es ist denkbar, dass auf tetraploidem Level ein Teil der von HORN (1994) noch erfolglos praktizierten

Kreuzungen möglich wird.

Auswirkungen der Ploidiestufe auf das Auftreten und die Intensität von Kern-Plasma-Wechselwirkungen konnten für *Nicotiana* (SCHMITZ-LINNEWEBER et al. 2005, HERRMANN et al. 2003) und *Rhododendron* (SAKAI et al. 2004) belegt werden. Abschnitt 4.8 fasst Erkenntnisse aus interspezifischen *Pelargonium*-Kreuzungen zusammen, die auf tetraploidem Level mit dem Ziel der züchterischen Nutzung von Hybridvariegationen durchgeführt wurden.

4.2 Kombinationszüchtung

Nach Polyploidisierung und anschließender Einkreuzung bestehender Chlorophyllvarianten in aktuelle tetraploide Sortimente liegen periklinalchimärische Nachkommenschaften von insgesamt fünf Plastomvarianten vor. Die generelle Kompatibilität der teilweise vor über 100 Jahren beschriebenen Plasmavarianten mit dem bestehenden Sortiment gilt damit als erwiesen. Phänotypisch zeigen die bislang vorliegenden F1-Pflanzen die Bandbreite eines Kreuzungsansatzes auf tetraploider Stufe, wobei die aus somatischer Polyploidisierung hervorgegangenen tetraploiden Weißrandvarianten sämtliche Allele paarweise tragen. Die damit verbundene Einschränkung der Spaltungsverhältnisse fällt spätestens in der F2 bei Rückkreuzung mit tetraploiden Sorten nicht mehr ins Gewicht. Bereits in der F1 ließen sich innerhalb des vergleichsweise kleinen Bestandes von knapp 30 Pflanzen Genotypen selektieren, die hinsichtlich ihrer Blüteneigenschaften das bestehende Sortiment diploider Weißrandvarianten überflügeln. Während periklinalchimärische Sprosse und die abvermehrten Varianten nur mäßig wüchsig sind, zeigen grüne Sprosse isogener Konstitution (entstanden nach somatischer Segregation, die chimärischen Konstitutionen sind erstaunlich stabil(!)) ein sehr kräftiges Wachstum. Das heißt, die offenbar recht rasche Annäherung an das bestehende grünlaubige Sortiment in Bezug auf die Blüteneigenschaften findet im vegetativen Bereich zunächst keine Parallele. Das schwache Wachstum der entstandenen Weißrandvarianten hat entweder physiologische Ursachen, die sich aus Kern-Plasma-Wechselwirkungen ergeben oder es ist auf die reduzierte chlorophyllführende Blattfläche zurückzuführen. Ein Einfluss der genetisch determinierten kompakten Wuchsform der Hochleistungssorten zeichnet sich in der F1 noch nicht ab. Rückkreuzungen mit aktuellen Formen werden zu einer Beruhigung des vegetativen Wachstums führen. Es bleibt abzuwarten, ob die bislang registrierten Aufwerfungen im Bereich der Laubblätter dann weiterhin zu beobachten sind.

Die beiden in die F2 überführten Plasmotypen ('Contrast' und 'Hills of Snow') zeigen, dass mit WR-Formen der F1 züchterisch weiter gearbeitet werden kann. Ein rekurrentes Züchtungsprogramm mit dem Ziel der Introgression (eigentlich: Addition) eines extranukleären Merkmals ist also denkbar. Alle Selektionsschritte sind bei der Arbeit mit extranukleären Erbträgern an die Etablierung des erwünschten Plasmotyps in der L2 der Nachkommenschaft gebunden. Bereits ohne den Rückgriff auf biotechnologische Verfahren (4.10.1), kann, eine intensive gärtnerische Betreuung des Materials vorausgesetzt, am Ende einer Vegetationsperiode mit einem Teil der Sämlinge weiter gearbeitet werden (4.4).

Als zusätzliches Merkmal von *Pelargonium*-Weißrandvarianten kann die rötliche Zonierung der Laubblätter züchterisch beeinflusst werden. Die Überlagerung des Übergangsbereiches (grün zu

weiß) mit in den Zellvakuolen lokalisierten Farbstoffen (vermutlich Anthocyanen, AMOATEY und TILNEY-BASSETT 1993) erlaubt prinzipiell die Entstehung vierfarbiger Typen (weiß, rot, braun, grün). Bereits GRIEVE (1868) empfiehlt die Einbeziehung von Sorten mit möglichst weit außen liegender Zone in Kreuzungen mit weißbunten Varianten. Für einzelne Sorten konnten AMOATEY und TILNEY-BASSETT (1993) auf diploider Ebene Allele für Lage und Breite von Zonierungen bestimmen. Auf tetraploider Ebene liegen keine Untersuchungen vor, jedoch liegt die Verwendung zonierter Rückkreuzungspartner selbstverständlich nahe, wenn eine Drei/Vierfarbigkeit angestrebt wird. Überraschend ist jedoch eine Beobachtung an einer F1-Pflanze aus 'Wilhelm Langguth 4x'. Die über dem grünen Binnenfeld der Variante deutlich ausgeprägte Zone endet exakt am Übergang zum L2-bürtigen chlorophylldefekten Blattrand (Abb. 48). Anders als bei den Nachkommenschaften aus 'Flower of Spring 4x' und 'Contrast 4x', die auch in hellen Blattbereichen rötliche Farbstoffe bilden, scheint bei der Plastiden-Ribosomen-defizienten (4.6) 'W. Langguth' die Anthocyan synthese in weißen Gewebesegmenten weitgehend blockiert zu sein. In der Literatur ließen sich keine Hinweise auf plastomcodierte Reaktionsschritte im Verlauf des tiefgehend untersuchten Flavonoidstoffwechsels finden, so dass die biochemischen Hintergründe der Erscheinung zunächst im Dunkeln bleiben. Zonierte Formen unter Beteiligung der Plasmavariante aus 'W. Langguth' können zunächst nicht das Ziel praktischer Züchtungsbemühungen sein.

4.3 Chimärische Konstellationen auf tetraploider Ebene

Aus gärtnerischer Sicht erwiesen sich die Blattmusterproportionen tetraploider WR-Pflanzen als generell problematisch. Alle im Rahmen der vorliegenden Untersuchung entstandenen tetraploiden xWG-Varianten weisen unabhängig von ihrer Entstehungsweise sehr breite Blattränder auf. Die Vermarktung der bislang vorliegenden Typen ist ausgeschlossen. Für die Musterproportionen auf tetraploider Ebene müssen histogenetische Prozesse verantwortlich gemacht werden, die bereits in frühen Stadien der Blattdifferenzierung valenzabhängig ablaufen. Diese These wird von Beobachtungen an WGG- und GWW-Varianten gestützt. An den tetraploiden Pflanzen bzw. Sprossen lassen sich L1-Beteiligungen am Laubblattrand in einer auffallenden Regelmäßigkeit beobachten, die in dieser Form auf diploider Ebene niemals registriert wurde. Apikale Umlagerungen wie beispielsweise L1-Reduplikationen konnten hingegen auch nach mehrfacher Abvermehrung einer WGG-Variante nicht beobachtet werden.

Die Beteiligung von L1-Deszendenten am Blattaufbau wird in der Literatur aus verschiedenen Blickwinkeln betrachtet. Eine von TILNEY-BASSETT (1986) vorgenommene Klassifikation wird von WEGNER (1998) in strukturierter Form wiedergegeben. Demnach unterscheiden sich zunächst monokotyle und dikotyle Formen tendenziell in ihrem Blattaufbau. Innerhalb der Gruppe der Dikotylen werden Gewebeteilungen im Blütenbereich von den Zuständen im Laubblatt abgegrenzt. Die Laubblatthistogenese dikotyler Pflanzen wird unter dem Aspekt der L1-Beteiligung am Mesophyllaufbau in zwei Gruppen geordnet. Während ein „abnormaler“ Histogeneseverlauf unter dem Einfluss wachstumsgestörter Gewebe auftritt, spiegelt die „normale“ Entwicklung die Differenzierung farbmarkierter Zellklone ohne Einfluss einer Wuchsanomalie wider (ideale GGG-Varianten können makroskopisch nicht analysiert werden). Für *P. x zonale* gelten L1-Beteiligungen

am Laubblattaufbau im „Normalfall“ als seltene Ereignisse, sie bleiben im Wesentlichen auf die Stipeln beschränkt. Weder sind regelmäßige L1-Mesophyll-Beteiligungen (L1-WR-Typen) nachgewiesen worden, noch konnten bislang unregelmäßige Epidermisaufspaltungen (Ohren-Typen) beobachtet werden. Alle bekannten Klone mit phänotypisch auffälligen L1-Deszendenz im Laubblatt werden auf wuchsgehemmte L2-bürtige Komponenten zurückgeführt, die Periklinalisierungen der Epidermis provozieren (WEGNER 1998, POHLHEIM 1973, 1977 und 1983, BERGANN 1962a, BERGANN und BERGANN 1959).

Mit den beiden WGG-Formen aus 'Hills of Snow 4x' x 'Sorte' liegen erstmals innerhalb der Gattung *Pelargonium* Monektochimären mit „immerspaltender Epidermis“ vor. Intraspezifische Wechselwirkungen, insbesondere die Förderung einer epidermalen Aufspaltung durch wachstumsgestörte subepidermale Zellen, können für die beiden Klone weitgehend ausgeschlossen werden. Karyologisch handelt es sich bei den F1-Pflanzen um Homohistonenten, auf diploider Ebene verhält sich der weiße Plasmotyp aus 'Hills of Snow' unauffällig. Kern-Plasma-Wechselwirkungen mit Auswirkungen auf die Vitalität weißer und grüner Gewebekomponenten sind prinzipiell denkbar, L1-Mesophyllbeteiligungen an GWG-Formen aus 'Flower of Spring 4x' bzw. GWW-Formen aus 'Contrast 4x' legen mit ihren inversen Mustern jedoch den maßgeblichen Einfluss der Ploidiestufe auf die Gewebekomposition im Laubblatt nahe.

Variationen im Ausmaß epidermaler Aufspaltungen im Laubblatt wurden bislang vorwiegend im Hinblick auf den Einfluss wachstumsgestörter, subepidermaler Zellschichten erörtert (*Pelargonium*, s.o., *Plectranthus*, POHLHEIM 2003, *Prunus*, POHLHEIM 1970, *Buxus*, POHLHEIM 1969). Daneben können Umwelteinflüsse (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Belichtung) die Gewebekomposition im Laubblatt variieren (*Ligustrum*, STEWART und DERMEN 1975 in: TILNEY-BASSETT 1986, *Buxus*, POHLHEIM 1969). POHLHEIM (1970, 1983) liefert Belege für Laubblattzusammensetzungen in Abhängigkeit ontogenetischer Entwicklungsstadien (*Acer*, *Prunus*: Langtriebe/Kurztriebe). Ein Einfluss cytochimärischer Konstitutionen (insbesondere von TDD-Varianten) auf L1-Blattrandbeteiligungen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht belegt werden. Für *Pelargonium*-Blüten ließen sich jedoch Variationen in der Gewebezusammensetzung nachweisen (RÖSSEL 1990, POHLHEIM und RÖSSEL 1989). Untersuchungen zur genetischen Determinierung der Laubblattzusammensetzung liegen nicht vor. Die Auflösung des Gewebeverbandes der notwendigerweise periklinalchimärischen Testpflanzen in der F1 erschwert diesbezügliche Versuchsansätze.

Bislang konnten nach Trifluralinbehandlung keine vollständig tetraploiden WR-Varianten gewonnen werden, so dass sich der Einfluss der Ploidiestufe auf die Laubblattkonstitution unabhängig von allelspezifischen Wechselwirkungen noch nicht eindeutig belegen lässt. Die Bandbreite des gewonnenen tetraploiden, periklinalchimärischen Materials legt jedoch den maßgeblichen Einfluss der Ploidiestufe auf die Gewebezusammensetzung im Laubblatt nahe.

Gängige Theorien zur Laubblatthistogenese unterstützen ein eher mechanisches Modell, wobei sich Gewebeanteile im Laubblatt auf intraindividuelle Konkurrenzmechanismen zurückführen lassen. WEGNER (2003a+b und 1998) betrachtet das meristematische Gewebe des Blattrandes als „entwicklungsmechanisches Analogon“ zum Sprossscheitel. Der maßgebliche Prozess, der Periklinalisierungen am Blattrand hervorruft, ist die „Entspannung“ (BERGANN 1962a) von L1-

Deszendenzen im Verlauf der Blattmorphogenese. Nach WEGNER (2003a+b) bestimmt das Verhältnis von Blattrandradius und Zellgröße die Stabilität der epidermalen Schicht, wobei mechanische Wechselwirkungen innerhalb der Blattanlagen Abweichungen von dem zugrunde liegenden geometrischen Modell verursachen. Gemäß dem Modell müssten sich im tetraploiden Versuchsmaterial disproportionale Größenverschiebungen histologisch nachweisen lassen.

Die aufwändigen histologischen Untersuchungen von RENNER (1936b) und insbesondere THIELKE (1948) konnten perikline Aufspaltungen der L1-bürtigen Deszendenz bei *P. x zonale* 'Freak of Nature' dokumentieren. Der gewählte atypische Klon lässt jedoch kaum Rückschlüsse auf die hier vorliegenden Musterungen zu. Periklinalisierungen werden von THIELKE „oberhalb des Blattstieles, außerdem überall auf den Randfeldern“ dokumentiert. Auch BERGANN (1962a) betrachtet die Orte, an denen Periklinalisierungen einer farbmarkierten Epidermis stattfinden, als „offenbar dem Zufall überlassen“. POHLHEIM (1969) weist nach, dass Periklinalisierungen der Epidermis bei einem *Buxus*-Klon in über 90 % der beobachteten Fälle auf das distale Blattende beschränkt sind. „Ohren“-Bildungen an den vorliegenden tetraploiden F1-Pflanzen besitzen einen auffällig regelmäßigen Charakter, der histogenetische Analysen vereinfachen dürfte.

Während die L1-Beteiligungen am Laubblattrand die gartenbauliche Verwendung tetraploider Weißrandvarianten grundsätzlich nicht beeinträchtigen (die Selektion von WWG-Formen überwindet die Problematik), muss die extreme Dominanz L2-bürtiger Zellen am Laubblattaufbau tetraploider Formen als fundamentales Problem betrachtet werden. Die Erörterungen zum Histogeneseverlauf von L1-Deszendenzen lassen sich analog auf die Entwicklung von L2-Derivaten projizieren. Die „Entspannung“ und perikline Aufspaltung L2-bürtiger Zellen im Verlauf der Blatthistogenese kann nicht auf die fehlende Konkurrenzkraft einer wachstumsgeschwächten, grünen (!) L3 zurückgeführt werden. Die Aufspaltung L2-bürtiger Gewebe scheint vielmehr wie die Periklinalisierung der Epidermis an anatomische Voraussetzungen gebunden zu sein, die sich im Verlauf der Blattdifferenzierung ergeben. Auf tetraploider Ebene liegen im distalen Laubblattbereich eng begrenzte Regionen vor, die eine epidermale Aufspaltung begünstigen. Insbesondere GWG-Formen aus 'Flower of Spring 4x' zeigen, parallel zu den ausgeprägten „Ohren“, L2-bürtige Gewebekeile bis hin zum Stielansatz. Die Aufspaltung der L2 wird offenbar im Vergleich zur diploiden Versuchspflanzen generell früher ausgelöst, gleichzeitig erreichen L3-bürtige Zellen häufig nicht die aus diploiden Vergleichsfällen bekannten Positionen im Laubblattzentrum. Vertiefende Untersuchungen sollten es ermöglichen die ploidiekorrelierte Basis für die offenbar schon sehr frühzeitige Verdrängung L3-bürtiger Zellen aus zentralen Bereichen des Primordiums auszuleuchten.

Dass für die Gewebekonstellation auf tetraploider Ebene primär der Valenzzustand des geschaffenen Materials verantwortlich gemacht wird heißt nicht, dass Musterproportionen nicht im Sinne des Züchters beeinflusst werden können. Im Untersuchungsverlauf konnten an den entstandenen periklinalchimärischen F1-Pflanzen Variationen in Bezug auf die Breite L2-bürtiger Blattränder beobachtet werden, wobei zunächst offen bleiben muss, inwiefern sich die Situation nach Abvermehrung in weiteren Vegetationsperioden manifestiert. Genetische Systeme, die das Ausmaß von Gewebebeteiligungen an der Organmorphogenese codieren, sind bislang unbekannt. In Rückkreuzungen empfiehlt sich natürlich die bevorzugte Verwendung vielversprechend

proportionierter Varianten, da ein allelspezifischer Hintergrund nicht ausgeschlossen werden kann.

Die sterile Sorte 'Melosilver' macht deutlich, dass auch auf tetraploider Ebene gärtnerisch akzeptable periklinalchimärische Weißrandvarianten möglich sind. Sie können über kombinationszüchterische Ansätze nur gewonnen werden, wenn es gelingt Plastomvarianten zu selektieren, deren Chlorophylldefekt mit einer ebenfalls plasmatisch codierten Wuchshemmung einher geht. Dabei ist es unerheblich, ob beide Merkmale auf eine genetische Störung zurückgeführt werden können (Pleiotropie) oder auf verschiedenen Plastomdefekten beruhen. Gleichzeitig muss die Fertilität derartiger Varianten erhalten bleiben. Bereits IMAI (1936) berichtet von einer spontanen Mustermodifikation an einem *Pelargonium*-Klon. STEWART et al. (1974) dokumentieren Kreuzungen mit einer spontan entstandenen Schmalrandvariante auf diploider Ebene. Bei deutlich reduzierter Fertilität des Klons gelang es nicht periklinalchimärische F1-Pflanzen zu gewinnen. Die Fertilität der beiden in Rahmen dieser Untersuchung entstandenen diploiden Formen aus 'Sophie Dumaesque' wurde bislang nicht geprüft. Bei vorliegender Kombinationseignung wären die beiden Varianten primäre Kandidaten für Polyploidisierungen, wobei zunächst nicht belegt werden kann, ob die beobachteten zusätzlichen Defektmutationen extrachromosomaler Natur sind.

Rückkreuzungen tetraploider Weißrandvarianten mit aktuellen Sorten dürften in absehbarer Zeit Formen mit überzeugenden Blüteneigenschaften hervorbringen. Spontane bzw. induzierte Mutationen mit Auswirkungen auf die Vitalität der chlorophylldefekten L2 dieser Formen können dann Schmalrandvarianten hervorbringen, wobei die selektierten Blütenmerkmale weitgehend erhalten blieben (Blüten von 'Melosilver' sind im Vergleich zur Ausgangssorte 'Melody' kleiner).

Kreuzungen mit 'Mrs Parker' auf diploider Stufe liefern Indizien für einen karyogenetischen Hintergrund der auffällig schmalen Ränder der Ausgangsform. In der F1 wird auf diploider Ebene deutlich, dass die eingeschränkte Vitalität des chlorophylldefekten Blattrandes nicht an den Plastidentyp gebunden ist. Vergleichbar ist die Situation auf tetraploider Ebene mit der Variante 'W. Langguth 4x'. Die selbst in der Konstellation DTD/GWG noch vergleichsweise schmalen Ränder der Sortenvariante sind offensichtlich auf eine zusätzliche kerncodierte Wuchshemmung zurück zu führen, die auf tetraploider Ebene in der F1 nicht mehr wirksam wird. Hier offenbart sich möglicherweise die züchterische Anpassung der Sorte im Verlauf ihrer über 100jährigen Kultur.

Für hinsichtlich ihrer Blütenmerkmale „fertige“ WR-Kreuzungen ist es unerheblich, ob zusätzliche Mutationen im Zellkern oder extrachromosomal die notwendige Vitalitätseinschränkung in der L2 bewirken und ob mit der zusätzlichen Defektmutation eine Sterilität verbunden ist. Die Wahrscheinlichkeit, in einem Versuchspflanzenbestand eine L2-gebundene Defektmutation, die sich in einer auffallenden Musterproportionsverschiebung offenbart, zu selektieren darf, auch wenn es sich um tetraploides Material handelt, als überschaubar eingeschätzt werden.

STEWART et al. (1974) dokumentieren auf diploider Ebene Sprosse der Konstitution GWWG sowie GWWWG in Folge histogenetischer Umlagerungsprozesse. Am diploiden Ausgangsmaterial konnten im Rahmen der vorliegenden Untersuchung keine vergleichbaren Konstellationen registriert werden. Die vorgestellte Variante GWWG erinnert in ihren Farbproportionen an GWG-Formen auf tetraploider Stufe. Die chimärische Konstellation der xWG-Varianten auf tetraploider

Ebene ließ sich jedoch histologisch absichern. Die Beteiligung von mehr als drei Scheitelschichten am *Pelargonium*-Sprossaufbau konnte auf tetraploider Ebene ausschließlich nach somatischer Segregation registriert werden, farbmarkierte internale Zellen blieben in den beobachteten Fällen auf die Sprossachse beschränkt. Es ist anzunehmen, dass die vegetativen Entmischungsprozesse nach biparentalen Erbgängen prinzipiell alle denkbaren chimärischen Konstellationen hervorbringen. Die Beteiligung von Deszendenz einer vierten apikalen Zelllage am Laubblattaufbau wurde niemals beobachtet, die weitgehende Verdrängung bereits der dritten Schichtendeszendenz aus dem Laubblatt ließ das auch nicht erwarten.

WEGNER (2000a+b) führt die Anzahl theoretisch möglicher Sprossscheitelschichten auf einen konstanten Faktor (3,85 cell units) zurück, aus dem sich in Relation zum Radius des Scheitels die Zahl unabhängiger Scheitelschichten berechnen lässt. Nur wenn sich Zelldurchmesser (cell units) und Apexradius nach einer Valenzerhöhung disproportional ändern, sind Auswirkungen auf theoretisch mögliche Scheitelkonstitutionen denkbar. WEGNER (2000a) verweist ausdrücklich auf den theoretischen Charakter von Berechnungen an idealisierten Modellen, seine empirischen Untersuchungen an *Pelargonium*-Sprossscheiteln (2000b) wiesen recht deutliche Abweichungen von vorhergesagten Strukturen auf.

Das vorliegende buntlaubige Pflanzenmaterial zeigt in der Laubblatthistogenese Auffälligkeiten, die möglicherweise Rückschlüsse auf die Zustände im Sprossscheitel erlauben. Denkbar ist, dass die frühen periklinen Aufspaltungen von Epidermis und Subepidermis im Verlauf der Blattdifferenzierung Proportionsverschiebungen (Zelldurchmesser/Apexradius) im Sprossscheitel widerspiegeln, die sich nach einer Polyploidisierung einstellen. Die Zahl möglicher Scheitelschichten, die Anzahl der ins Laubblatt bzw. in Lateralknospen eingehenden Schichten sowie das Ausmaß von L1-Beteiligungen am Mesophyllaufbau müssen in ihrem Zusammenhang analysiert werden. Anhand des geschaffenen Materials dürfte es möglich sein, die von BERGANN (1955a+b in WEGNER 2000a und 1998) und WEGNER (2003a, 2000a, 1998) postulierten geometrischen Zusammenhänge experimentell zu überprüfen.

In der Literatur ließen sich Hinweise auf eine doppelte Markierung der Ausgangsvariante 'Hills of Snow' finden (TILNEY-BASSETT et al. 1995, ALMOUSLEM et al. 1991). Blüten der WR-Laubblattvariante zeigen ein schwach ausgeprägtes Kern-Rand-Muster, das auf die Konstitution L1: rosa, L2: rot zurückgeführt wird. Offenbar induziert die genetisch rote subepidermale Zellschicht in der alleine farbstoffführenden Petalenepidermis einen Farbumschlag (vergl. PLASCHIL 1997, RÖSSEL, 1990, POHLHEIM und RÖSSEL 1989). Die entstandene GGW-Variante mit einheitlich rosafarbenen Blüten ist demnach aus einer L1-Reduplikation hervorgegangen. Trifluralin-induzierte Ploidiechimären aus 'Hills of Snow' tragen eine dritte genetische Markierung. Gelingt es Formen mit tetraploiden Gewebekomponenten abzuvermehren, so können valenzkorrelierte Histogeneseprozesse sowohl im Laubblatt als auch in der Blüte verfolgt werden.

4.4 Quantitative Parameter biparentaler Erbgänge

Aus züchterischer wie aus wissenschaftlicher Sicht sind Aussagen zu quantitativen Parametern biparentaler Erbgänge von Bedeutung. Praxisrelevant ist ein möglichst hoher Output an variegaten Sämlingen, die zu periklinalchimärischen Jungpflanzen entmischen. Wissenschaftlich sind derartige Daten nur sehr aufwändig zu erfassen, alle genetischen Untersuchungen sind bislang auf die diploide Stufe beschränkt. Kreuzungen mit isogenen Linien, das heißt karyogenetisch identischen Klonen, die sich nur im Plasmotyp unterscheiden, ermöglichten die Aufstellung eines komplementären genetischen Modells (AMOATEY und TILNEY-BASSETT 1994, TILNEY-BASSETT et al. 1992, TILNEY-BASSETT und ALMOUSLEM 1989, TILNEY-BASSETT 1988). Der nachgewiesene kerngenetische Einfluss (Prädetermination) insbesondere der Mutterpflanze auf die Plasmazusammensetzung innerhalb der Zygote und somit den Anteil an variegaten Sämlingen kann jedoch nur speziell für die getesteten Kombinationen gelten.

Interessant ist der Einfluss der Ploidiestufe auf das Entmischungsverhalten nach biparentalen Erbgängen. Mathematische Modelle (MICHAELIS 1955 in HAGEMANN 1964) klammern zwar allelspezifische Wechselwirkungen aus, sie prognostizieren jedoch verzögerte Entmischungen bei erhöhter Plastidenzahl (die zufällige Verteilung plasmatischer Erbträger auf Tochterzellen wird dabei ebenso vorausgesetzt wie ein ursprüngliches Mischungsverhältnis von 1:1). BUTTERFASS (1979) gibt für 130 autoployploide Taxa bei Verdoppelung des Chromosomensatzes eine Steigerung der Plastidenzahl je Zelle um durchschnittlich 70 % an. Es liegt nahe, auch für tetraploide *Pelargonium*-Zygoten höhere (Pro-)Plastidenzahlen anzunehmen.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse erlauben es nicht, Aussagen zum Entmischungsverhalten auf tetraploider Ebene belastbar zu verifizieren. Die unterschiedlichen Kombinationen plasmatischer Erbträger auf diploider und tetraploider Ebene wie auch möglicherweise vorhandene karyogenetische Einflüsse auf das Segregationsverhalten verbieten eine eindeutige Aussage. Für die Varianten 'Hills of Snow', 'Frank Headley' und 'Flower of Spring' liegen Kreuzungsergebnisse (w x g) auf diploider und tetraploider Ebene vor. In allen drei Fällen wurden auf tetraploider Ebene prozentual mehr variegata F1-Sämlinge beobachtet als im diploiden Vergleichsfall (16 %:5%, 11 %:4 %, 27 % und 49 %:11 %). Der Umfang der Testkreuzungen war dabei jedoch vergleichsweise gering.

Als ein wesentlicher Einflussfaktor auf die Anzahl variegater Sämlinge in der F1 erwies sich insbesondere auf tetraploider Ebene die Kreuzungsrichtung. Für die züchterische Praxis kann die Verwendung variegater Formen als Mutterpflanzen empfohlen werden. Mit Ausnahme der Sorte 'Contrast' wurden auffallend asymmetrische Kreuzungsergebnisse erzielt, die einen bevorzugt maternalen Einfluss auf den Erbgang unabhängig vom Genotyp nahe legen. AMOATEY und TILNEY-BASSETT (1994) konnten als Resultat sehr umfangreicher Kreuzungsversuche auf diploider Ebene den genetischen Einfluss der Mutterpflanze auf die Plastidenzusammensetzung in der F1 belegen. Die auf diploider Ebene durchgeführten Versuche ergaben ein genetisches Modell basierend auf 2 Genen mit jeweils 2 Allelen. Mit 'Flower of Spring 4x' steht eine autotetraploide Form mit bekannter genetischer Konstitution zu Verfügung ((Pr1pr1, Pr2pr2) x 2, Pr,

plastid replication) (TILNEY-BASSETT et al. 1992). Es bleibt zu klären, inwieweit die betont maternalen Kombinationen auf tetraploider Ebene allelspezifisch determiniert sind.

Kreuzungsanalysen ergaben in der Vergangenheit verschiedentlich Hinweise auf unterschiedliche Vermehrungsraten farbmarkierter Plastiden innerhalb der Gattung *Pelargonium*. (ABDEL-WAHAB und TILNEY-BASSETT 1981, HAGEMANN 1976). Dabei werden Unterschiede in plastidären Multiplikationsraten in erster Linie auf diese selbst zurück geführt: „The genetic determinants for the differences in plastid multiplication rates reside predominantly the organelles themselves“ (HERRMANN et al. 2003). HAGEMANN (1976) schreibt insbesondere den gelblichen Plastiden der Sorte 'Mrs Pollock' eine gegenüber den untersuchten weißen Formen überlegene Konkurrenzfähigkeit zu. Auf tetraploider Ebene kam mit 'Contrast 4x' eine phänotypisch sehr ähnliche Variante zum Einsatz. Anders als in der Gattung *Oenothera*, in der zahlreiche Plastomtypen nachgewiesen werden konnten (in HAGEMANN 1964, KIRK und TILNEY-BASSETT 1978), vermutet TILNEY-BASSETT (1991) für die gärtnerisch genutzten Pelargonien vergleichsweise wenige Plastomvarianten. Es ist demnach anzunehmen, dass die weißgelbe Plastomvariante aus 'Mrs Pollock' dem Plastidentyp in 'Contrast' entspricht. Reziproke Kreuzungen mit 'Contrast' auf tetraploider Ebene bringen unabhängig von der Kreuzungsrichtung auffallend viele variegated Sämlinge hervor. Gleichzeitig lassen sich die extranukleären Mischzustände über Jahre auch in adulten Pflanzen erhalten. Rückkreuzungen variegater F1-Pflanzen mit aktuellen Sorten ergaben in der F2 ebenfalls lang anhaltende Mischzustände. Die Unabhängigkeit des Segregationsmusters von der karyogenetischen Konstitution der *P. x zonale*-Nachkommenschaften wird für den Plastotyp aus 'Contrast' deutlich.

Über die Sorten 'Mrs Pollock' und 'Golden Chain' lässt sich 'Contrast' mit einiger Sicherheit auf einen Farbsport an *P. inquinans* zurückführen (GREAVE 1868). Das auffällige Entmischungsverhalten der Variante wird im Hinblick auf die Entstehung weiterer Farbvarianten unter 4.8 diskutiert.

Einen wesentlichen Einfluss auf den Segregationsprozess besitzt neben der Vermehrungsgeschwindigkeit das Verteilungsmuster der Plastiden innerhalb der Zelle. GUO und HUO (1995) konnten die zufällige Verteilung und Durchmischung maternaler und paternaler Organellen in der Zygote elektronenmikroskopisch nachvollziehen. Beide Typen unterscheiden sich morphologisch und konnten auch nach der ersten Teilung der Zygote sowohl in der Basal- als in der Apikalzelle nachgewiesen werden. KUROIWA et al. (2002) weisen dagegen für maternale (Pro-) Plastiden eine ungleichmäßige Distribution nach. Im Anschluss an die erste Teilung der Zygote verbleibt der überwiegende Teil der mütterlichen Plastiden in der mikropylennahen Region der Basalzelle. HAGEMANN (1992) vermutet auf Grund genetischer Analysen ebenfalls eine gestörte Verteilung der biparental kombinierten Organellen in der Zygote. Der physiologische Wirkmechanismus des Systems bleibt bis heute weitgehend unverstanden, die Art eines möglichen kerngenetischen Einflusses der Mutterpflanze auf die sich entwickelnde Zygote ist unklar. HERRMANN und HAGEMANN (1971) dokumentieren erstmals Mischzellen nach biparentalen Kreuzungen mit 'Mrs Pollock'. BÖRNER et al. (1972) zeigen Mischzellen nach Kreuzungen mit 'Mrs Parker'. Die Verteilung beider Plastidentypen in den Zellen der untersuchten Keimblätter kann anhand der publizierten Abbildungen als zufällig eingestuft werden. Es ist bislang ungeklärt,

inwiefern lang anhaltende Mischzustände nach Kreuzungen mit 'Mrs Pollock' bzw. 'Contrast' auf die gleichmäßige Verteilung mütterlicher und väterlicher Plastiden im Cytoplasma zurückzuführen sind und ob die weitgehende Durchmischung der Plastiden den „Normalfall“ widerspiegelt (4.8). Kreuzungen mit 'W. Langguth' bzw. 'Flower of Spring' brachten nicht selten Sämlinge mit symmetrischen Mustern auf den Kotyledonen hervor. Es muss davon ausgegangen werden, dass derartige Variegationen auf Plastidensegregationen zurückzuführen sind, die bereits bei Anlage der Keimblätter („Herz-Stadium“ der Embryogenese, KHERA und TILNEY-BASSETT 1976, ADAMS 1971) abgeschlossen waren. Die Annahme, dass es sich bei derartig frühzeitigen Entmischungen um nicht-stochastische Prozesse handelt, erscheint berechtigt.

Neben der Erzeugung variegaten Ausgangsmaterials ist die Gewinnung periklinalchimärischer Formen aus weißbunten Sämlingen unter quantitativen Gesichtspunkten von Interesse (4.10.1).

4.5 NMH-induzierte Plastommutationen

Spontane Plastommutationen sind mit einer geschätzten Rate von 1:50000 vergleichsweise seltene Ereignisse. Für spezifische chloroplastencodierte Merkmale wird sogar eine Größenordnung von $1:10^9$ geschätzt (nach FLUHR und CSÉPLO 1986). Die experimentelle Induktion von Plastommutationen an höheren Pflanzen gelang zunächst MICHAELIS (1958) über radioaktiven Schwefel und Phosphor und später RÖBBELEN (1962) über Röntgenbestrahlungen (beide nach HAGEMANN 1964). Erste Hinweise auf die mutagene Wirkung von NMH lieferten Mutationsversuche an *Drosophila* (PASTERNAK 1963 und RAPOPORT 1963, beide nach GLÄSS und MARQUARDT 1968). Studien an Angiospermen belegten nach Applikation des Wirkstoffes zunächst genetische Defekte auf karyochromosomaler Ebene (*Arabidopsis*, MÜLLER 1964). Einen ersten Beleg für die bevorzugt extranukleäre Wirkung NMH-verwandter, alkylender Verbindungen lieferten Untersuchungen von RÖBBELEN (1963 und 1965). Chemisch induzierte Mutationen konnten dabei erstmals über Mischzellenuntersuchungen sowie Kreuzungsanalysen in den Plastiden lokalisiert werden. SCHWAIER et al. (1968) erbrachten einen frühzeitigen Beleg für die spezifische, extrachromosomale Wirkung von NMH bei *Saccharomyces*. Erste NMH-induzierte Plastommutanten wurden von BELEZKII et al. (1969) bei *Helianthus* erzeugt. In der Folgezeit konnten HENTRICH und BEGER (1974) sowie POHLHEIM und BEGER (*Saintpaulia*, 1974, dazu POHLHEIM 1981a) und HAGEMANN (*Antirrhinum*, 1976) jeweils ungewöhnlich hohe Anteile variegater Versuchspflanzen nach NMH-Einwirkung dokumentieren (jeweils über 50 % des behandelten Materials), wobei HENTRICH, BEGER und POHLHEIM erstmals vegetativ vermehrtes Material in Untersuchungen einbezogen. HOSTICKA und HANSON (1984) wiesen 7 Monate nach Samenbehandlungen nahezu 50 % variegater *Lycopersicum*-Mutanten nach. Einige Autoren konnten nach Mutagen-Behandlungen periklinalchimärische Chlorophyllvarianten dokumentieren (BENGUS 1999, KIEŁCZEWSKI 1989, HOSTICKA und HANSON 1984, POHLHEIM 1981a+b, HENTRICH und BEGER 1974). Einen vorwiegend praxisorientierten Züchtungsansatz verfolgte ausschließlich BENGUS, der 5 periklinalchimärische *Weigela*-Formen (2 WR sowie 3 WK) erhielt. Leider fehlen hier Angaben zum Umfang des behandelten Materials. Abbildungen der von KIEŁCZEWSKI (1989) geschaffenen *Catharanthus*-Mutanten lassen eine gartenbauliche Nutzung induzierter Weißrandformen dieser Gattung möglich erscheinen.

HAGEMANN (1982) dokumentiert variable Reaktionen von *Lycopersicum*- und *Antirrhinum*-Samen auf gestaffelte NMH-Applikationsvarianten. Es wird deutlich, dass Samenbehandlungen, wie sie auch im Rahmen der vorliegenden Untersuchung an *Pelargonium* durchgeführt wurden, in Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Saatgutes artspezifisch angepasst werden müssen. Der Einfluss einer für *Pelargonium* obligatorischen Samenvorbehandlung (Ätzen, Anschneiden) muss in weiteren Versuchen Berücksichtigung finden.

Mit einem Anteil von 13 % phänotypisch veränderter Pflanzen bei 5h Einwirkungszeit einer 2 mMol NMH-Präparation (Ansatz nach HAGEMANN 1982) wurden aus Dresden im Vergleich zu den angeführten Veröffentlichungen deutlich geringere Mutationsraten übermittelt. Die getestete Konzentration 20 mMol brachte bei Einwirkungszeiten zwischen 1h und 5h jeweils noch schlechtere Ergebnisse. 50 % der von HOSTICKA und HANSON (1984) beschriebenen Laubblattvarianten erwiesen sich als steril. Die Vermutung, dass es sich bei vielen dieser Pflanzen um Typen handelt, die auch im übertragenen Sinne keinen züchterischen Wert besitzen, erscheint berechtigt. Die Kopplung von Chlorophylldefektmutationen mit zum Teil massiven Wuchsanomalien konnte auch an dem in Berlin beobachteten Material registriert werden. Es ist anzunehmen, dass die wenigsten beschriebenen NMH-induzierten Plastomvarianten Laubblattmuster hervorbringen, wie sie aus dem diploiden *Pelargonium*-Sortiment bekannt sind.

Neben der nachvollziehbar kritischen Selektion auf Seiten eines praktischen Züchtungsbetriebes können auch genetische Faktoren als Ursache für vergleichsweise geringe Mutanten-Ausbeuten herangezogen werden. Nach PALMER (1985) sowie PALMER et al. (1987) besitzt das *Pelargonium*-Plastom eine außergewöhnliche Struktur. Bei einem Gesamtumfang von 217-241 kbp dominiert ein 76 kbp „inverted repeat“ resultierend in der Duplikation zahlreicher Gene, die sich sonst in der „single copy region“ befinden. TRIBOUSH et al. (1999) machen für NMH-induzierte (Rück-)Mutationen punktuelle genetische Veränderungen verantwortlich. Liegen innerhalb eines cpDNA-Stranges Gene doppelt vor, so sind phänotypisch wirksame Punktmutationen möglicherweise nur in singulären Abschnitten zu erwarten. Während bei *Pelargonium* über die Hälfte aller Plastidengene in duplizierter Form vorliegt, ist der redundante Anteil im hochgradig konservierten „Normalfall“ auf nur ca. 25 % beschränkt.

Neben Plastommutationen induziert NMH in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration auch Chromosomenaberrationen (in USATOV et al. 2005, MARCOTRIGIANO und HACKETT 2000, HOSTICKA und HANSON 1984, MÜLLER 1964). Bis heute sind Ursachen für die vergleichbar spezifische extranukleäre Wirkung der Chemikalie nicht eindeutig belegt. TRIBOUSH et al. (1999) halten eine sequenzabhängige Interaktion von NMH und cpDNA für möglich. Nach FRIEDBERG (1985) können unterschiedliche DNA-Strukturkonformationen die Wirksamkeit von Mutagenen beeinflussen. Als wahrscheinlicher dürfen jedoch biochemische Wechselwirkungen der Verbindung und ihrer Abbauprodukte innerhalb der kompartimentierten Pflanzenzelle gelten. Innerhalb der Chloroplasten werden im Photosyntheseverlauf Redoxpotenziale aufgebaut, die zu pH-Werten zwischen 8 im Stroma und 5 im Thylakoid-Innenraum führen (in LÜTTGE et al. 1989). Nach HAGEMANN (1982) ist die Halbwertszeit von NMH bei Raumtemperatur hochgradig pH-abhängig. Im alkalischen Milieu erfolgt eine rasche Hydrolyse zu Diazomethan, aus dem in wässriger Lösung ein Carbenium-Ion hervorgeht, auf

welches die DNA-Methylierungen zurückzuführen sind. Anders als die Kern-DNA ist die cpDNA im Stroma der Chloroplasten höheren pH-Werten ausgesetzt. Möglicherweise ist die plastommutagene Wirkung von NMH auf reaktive Zwischenprodukte zurückzuführen, die bevorzugt in den Chloroplasten entstehen.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob mit der Behandlung ruhender *Pelargonium*-Samen die optimale Applikationsvariante gewählt worden ist. Wenn die spezifische Wirksamkeit von NMH insbesondere an photosynthetisch aktive Zellen gebunden ist, sind Behandlungen wüchsiger Explantate möglicherweise vielversprechender. Die Induktion plasmatisch codierter Streptomycinresistenz gelang ausschließlich an Sterilexplantaten von *Capsicum* und war mit Samenbehandlungen nicht erfolgreich (VENKATAIAH et al. 2005, RAO et al. 1997). HENTRICH und BEGER (1974), POHLHEIM und BEGER (1974) sowie POHLHEIM (1981a) dokumentieren erfolgreiche NMH-Behandlungen von Blattstecklingen bei *Saintpaulia*. Die klonale Vermehrung moderner *Pelargonium*-Sorten und die im Rahmen dieser Arbeit belegte Sterilität vieler Behandlungsvarianten machen Mutationsversuche an vegetativ vermehrtem Material (auch *in vitro*) zu einer denkbaren experimentellen Alternative. Der zunächst höhere Versuchsaufwand kann durch die direkte Nutzbarkeit von Chlorophylldefektvarianten gerechtfertigt werden. Die häufige Kopplung von induzierten Chlorophylldefekten mit Sterilität sowie Wuchshemmung muss aus züchterischer Sicht keinen Nachteil darstellen. Die erfolgreiche Sorte 'Melosilver' repräsentiert einen Typ, wie er durchaus auch aus Mutationsversuchen hervorgehen könnte.

4.6 Antibiotikabehandlung

Im Untersuchungszeitraum gelang es mit keiner der getesteten Applikationsvarianten stabile Chlorophylldefekte zu generieren. Die Farbverläufe auf den ausbleichenden bzw. ergrünenden Sprosssegmenten erinnern in keiner Weise an Segregationsmuster, wie sie nach Plastommutationen bzw. biparentalen Kreuzungen beschrieben wurden. Alle getesteten Wirkstoffkombinationen unterbinden die Chlorophyllsynthese über einige Wochen, wobei das Sprosswachstum weitgehend unbeeinträchtigt erhalten bleibt.

Die Wirkungsweise der getesteten Antibiotika ist auf molekularer Ebene geklärt. Spectinomycin und Streptomycin binden an die 30S Untereinheit bakterieller Ribosomen (CARTER et al. 2000). Rifampicin unterbindet die Transkription in Bakterien durch spezifische Deaktivierung prokaryotischer Polymerasen (CAMPBELL et al. 2001).

Plastiden-Ribosomen bestehen aus zwei Untereinheiten ribosomaler RNA und einer Reihe von Strukturproteinen. Zusammen mit 25 identifizierten Proteinen bildet eine 16S rRNA die 30S Untereinheit von Chloroplastenribosomen. 21 der 25 ribosomalen Proteine ließen sich auch in *E. coli* nachweisen, Strukturmodelle bakterieller und plastidärer Ribosomen weisen eine weitgehende Übereinstimmung auf (MANUELL et al. 2004, YAMAGUCHI und SUBRAMANIAN 2000, YAMAGUCHI et al. 2000). Die Annahme, dass aus der Humanmedizin bekannte, antibiotische Agenzien auf Plastiden in vergleichbarer Weise wirken, ist berechtigt (BÖTTGER et al. 2001). Chlorophyllverluste im Anschluss an eine Antibiotikabehandlung können als Beleg für eine gestörte extranukleäre Proteinbiosynthese gewertet werden.

Mutationen können Strukturabweichungen im Ribosomenaufbau und damit Antibiotikaresistenzen

hervorrufen (VENKATAIAH et al. 2005, FLUHR und CSÉPLO 1986). Für Getreide konnte eine generelle Unempfindlichkeit gegenüber Spectinomycin nachgewiesen werden (in ZUBKO und DAY 2002). Transplastome Pflanzen werden über den Einbau von Spectinomycin- und Streptomycin-Resistenzgenen selektiert (in BOCK und HAGEMANN 2000), den Wirkstoffen ausgesetzte Pflanzen zeigen bei vorliegender Resistenz keine Reaktion. Vergleichbare Mechanismen können für die getesteten *Pelargonium*-Klone ausgeschlossen werden. Die physiologische Reaktion des Materials auf alle eingesetzten Wirkstoffe entspricht der in der Literatur beschriebenen (ZUBKO und DAY 2002, 1998, PYKE et al. 2000, ROSEN 1954).

Offenbar gelingt es den Pflanzen auch nach zahlreichen Zellzyklen mit gestörter Proteinbiosynthese, die Transkription und Translation plastidärer Gene wieder aufzunehmen. Das heißt, entweder sind in den Plastiden auch nach etlichen Teilungen noch Strukturen vorhanden, die eine Ribosomenreorganisation erlauben, oder aus dem Cytosol gelangen Stoffe in die Zellorganellen, die die Umsetzung von ptDNA in rRNA sowie Strukturproteine ermöglichen.

Im Cytosol gebildete RNA-Polymerasen (NEP, Nucleus-Encoded Plastid RNA-Polymerase) können offenbar in Plastiden gelangen und wohl alle dort codierten Gene transkribieren. (HERRMANN et al. 2003, MACHE und LERBS-MACHE 2001). Phänotypische Auswirkungen einer gestörten plastideneigenen Polymerase werden beschrieben. Das Ausschalten eines PEP-relevanten Genes (PEP, Plastid-Encoded Plastid RNA-Polymerase) in transplastomem Tabak führt zu phänotypisch weißen Pflanzen (ALLISON et al. 1996). Nach KRAUSE et al. (2000) können nukleäre Polymerasen zwar alle plastidären Gene transkribieren, Gen-Expressionen werden jedoch auf post-transkriptionalem Level reguliert.

Wie auch immer Plastiden-DNA in strukturelle rRNA transkribiert wird, es bleibt unklar, wie ribosomale Strukturproteine, die im Plastom codiert sind, gebildet werden können, wenn deren Synthese durch Translation an vollständigen Plastidenribosomen nicht möglich ist. Nach YAMAGUCHI et al. (2000) werden 13 der 25 ribosomalen Strukturproteine von Spinat im Zellkern codiert und im Cytosol synthetisiert. Selbst bei NEP-basierter Transkription in den Plastiden muss die Synthese der verbleibenden 12 plastomcodierten Proteine in den Zellorganellen gewährleistet werden, wenn ein Export plastidärer mRNA ins Cytosol ausgeschlossen ist. Ausschließlich unter der Annahme, dass Plastiden-ribosomale Strukturproteine in den Organellen synthetisiert werden müssen, kann das von ZUBKO und DAY (1998) vorgestellte Modell zur Schaffung definierter Chlorophylldefektvarianten als prinzipiell möglich aufgefasst werden.

Fehlversuche zur Induktion Plastiden-Ribosomen-freier Tabakpflanzen sind dokumentiert (ZUBKO und DAY 1998). *In vitro*-Aussaaten auf Spectinomycin-versetzten Nährmedien brachten weiße Sämlinge, die im Kotyledonenstadium ihr Wachstum einstellten. Der Transfer auf wirkstofffreie Nährmedien führte zum Ergrünen des Materials. Die Autoren machen „species-specific differences in ribosome turnover“ für instabile Albinotypen verantwortlich. Bereits 1954 dokumentiert ROSEN Samen- und Laubblattbehandlungen mit Streptomycin an einer ganzen Reihe von Objekten. Fixierbare Albinovarianten wurden dabei nicht erwähnt.

Erfolgreiche Antibiotikabehandlungen können möglicherweise auf Mutationen zurückgeführt werden. Für *Euglena* konnten die mutagene Wirkung von Streptomycin nachgewiesen werden (HEIZMANN et al. 1982). In Verbindung mit einer massiven Reduzierung von ptDNA-Kopien je

Zelle konnten die Autoren regelmäßige Umlagerungen in Ribosomen-codierenden Bereichen feststellen. Mit einer spezifischen mutagenen Wirkung antibiotischer Agenzien ließen sich die von ZUBKO und DAY (2002) generierten Phänokopien existierender Chlorophyllvarianten ebenfalls erklären, jedoch sind die extrem hohen Raten an gewonnenen Albinovarianten (bis zu 100 %) ein Argument gegen mutative Zufallsprozesse. Das komplexe *Pelargonium*-Plastom erwies sich gegenüber mutagenen Behandlungen mit NMH als vergleichsweise widerstandsfähig (4.5). Möglicherweise sind auch Mutationen nach Antibiotikabehandlungen hier seltener zu erwarten.

Für die beschriebene Plastiden-Ribosomen-defiziente *Pelargonium*-Sorte 'Mrs Parker' (BÖRNER et al. 1973 und 1972) ist eine Entstehung unter Antibiotikaeinfluss ausgeschlossen (erste Beschreibung der Sorte: 1880; in CLIFFORD 1970). Die spontane Bildung von Zelldeszendenzen mit vollständigem Plastiden-Ribosomen-Verlust ist nur nach extrem asymmetrischer Teilung eines Chloroplasts mit anschließender Entmischung sowie apikaler Fixierung denkbar. Die Wahrscheinlichkeit einer derartigen Entstehung kann derzeit nicht abgeschätzt werden. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass ribosomendefiziente Albinoförmigkeiten ohne genetischen Defekt prinzipiell in anderen Gattungen analog zu erwarten wären. Insbesondere das Fehlen vergleichbarer Varianten in den weitreichend untersuchten Gattungen *Arabidopsis*, *Nicotiana* und *Antirrhinum* wirft diesbezüglich Fragen auf, zumal die Plastiden-Ribosomen-defizienten Typen „albostrians“ (*Hordeum*) und „iojap“ (*Zea*) jeweils auf die Aktivität von Kerngenen zurückgeführt werden (WALBOT und COE 1979, HAGEMANN und SCHOLZ 1962).

Hitze-Behandlungen (34 °C) brachten Plasiden-Ribosomen-defiziente Pflanzen hervor, die in den Chloroplasten kerncodierte Polymeraseaktivitäten aufwiesen (*Hordeum*: FALK et al. 1993). Mit dem Ziel der Virusfreimachung durchlaufen *Pelargonium*-Kultivare regelmäßig Thermotherapien, in denen Temperaturen bis 38 °C erreicht werden (HORST et al. 1976). Offenbar konnten über das in der züchterischen Praxis seit Jahrzehnten etablierte Verfahren keine vergleichbaren, stabilen Plasmavarianten gewonnen werden.

METZLAFF et al. (1981) weisen für die weiße Gewebekomponente von 'Mrs Parker' ein cpDNA-Restriktionsmuster nach, dass von 13 anderen *Pelargonium*-Sorten unterschieden werden kann (unter anderem auch von der Sorte 'W. Langguth', die nach CLIFFORD (1970) ein Blütenfarbsport von 'Mrs Parker' darstellt(!)). Das Auflösungsvermögen molekulargenetischer Analysen ist heute sicherlich höher, jedoch liefert die Untersuchung aus dem Jahr 1981 bereits einen ersten Hinweis auf Strukturabweichungen auf genetischer Ebene, die nach dem Modell der Plastiden-Ribosomen-Defizienz nicht unbedingt zu erwarten sind. STEINER et al. (1988) wiesen in weißen Geweben von 'Mrs Parker' drastisch reduzierte Mengen an ribosomaler RNA nach, wobei in den rRNA-codierenden Bereichen der cpDNA keine Sequenzunterschiede zu grünen Proben gefunden werden konnten. Die Autoren vermuten einen raschen Abbau ribosomaler RNA bzw. Störungen bei der Transkription plastidärer Gene als Ursachen für die sehr geringen rRNA-Mengen in albinotischen Geweben. Eine komplette Unterbindung der plastidären Translation durch eine vollständige Ribosomenfreiheit wird von den Autoren jedoch nicht in Erwägung gezogen.

Neben extranukleären Mutationen mit Auswirkungen auf den Plastiden-Ribosomen-Aufbau müssen Kern-Plasma-Wechselwirkungen nach biparentalen Erbgängen als Ursache für den Chlorophyll-

verlust der Sorte diskutiert werden (4.8).

4.7 Polyploidisierung

Die Wirkung von Kolchizin auf den Teilungsapparat von Pflanzenzellen wird bereits seit 1937 experimentell genutzt (BLAKESLEE und AVERY 1937). In jüngerer Zeit rücken zunehmend antimitotische Wirkstoffe in den Vordergrund, die ursprünglich in Herbiziden Verwendung fanden. Während Oryzalin und Trifluralin der Gruppe der Dinitroaniline zugerechnet werden, gehört Amiprofos-Methyl zur Gruppe der Phosphoramine. Hinsichtlich der Wirkungsweise konnten für beide Stoffgruppen auf molekularer Ebene identische Mechanismen ausgemacht werden (ELLIS et al. 1994). Verbindungen aus der Gruppe der Dinitroaniline binden sehr spezifisch an Mikrotubuli von Pflanzen und Protozoen und lösen damit Störungen bei der Chromosomenverteilung aus (MORRISSETTE et al. 2004, MOREJOHN et al. 1987). In der gärtnerischen Praxis dürfte neben der Effektivität von Polyploidisierungsexperimenten insbesondere die geringe Toxizität der Chemikalien im Vergleich zu dem hochgiftigen Kolchizin eine Rolle spielen. Vertebraten zeigen sich gegenüber dem Wirkstoff Trifluralin tolerant (Hund, LD50 oral, > 2000 mg/kg) (ANONYM 2002). Die Wirksamkeit handelsüblicher Herbizide auf Basis von Dinitrotoluidin (z.B. Oryzalin: Surflan®) und ihre Verwendbarkeit in der Pflanzenzüchtung konnte belegt werden (TAKAMURA et al. 2002), so dass zu den teuren Reinstoffen auch preiswerte Alternativen bestehen.

Von den an *Pelargonium* getesteten Wirkstoffen erwies sich Trifluralin in einer Konzentration von 0,075 % als am besten geeignet, Polyploidisierungen der sporogenen L2 zu induzieren. 8 % der behandelten Varianten brachten L2-tetraploide Sprosse hervor, die sich als phänotypisch auffällig erwiesen. Über Pollenmessungen konnte der tetraploide Zustand sporogener Gewebe verifiziert werden. Die beobachteten Größenverhältnisse von kumulativ 1:1,23 (diploid:tetraploid; Pollendurchmesser) sind so deutlich, dass die Vermessung einer Charge von 50 Pollenkörnern unter praktischen Gesichtspunkten als ausreichend empfohlen werden kann. Aus von PHILIPPI (1961) veröffentlichten Größendiagrammen lässt sich in etwa ein Verhältnis von 1:1,25 für vitale Pollenkörner ablesen. CRAMER (1999) ermittelte eine Relation von 1:1,34.

Im Hinblick auf die Selektion und Weiterverwendung L2-tetraploider Typen erwiesen sich Knospenbehandlungen *in situ* als eine effektive Behandlungsform. Samenbehandlungen schieden auf Grund der zu erwartenden Mischzustände in der F1 generell aus. Wirkstoffapplikationen über das Nährmedium *in vitro* sind prinzipiell möglich (TAKAMURA et al. 2002), Selektion und Verifikation von Behandlungserfolgen sind allerdings aufwändiger, die kombinationszüchterische Weiterbearbeitung polyploidisierter Typen ist erst nach deren Überführung ins Gewächshaus denkbar und damit zeitaufwändig.

Im Gewächshaus ließen sich Sprosse bzw. Sprosssegmente mit tetraploider L2 über deutliche Proportionsverschiebungen ihrer Laubblattmuster identifizieren. Die Auswirkungen cytochimärischer Konstitutionen auf periklinalchimärische Musterungen wurden bereits verschiedentlich beschrieben (*Sansevieria*, POHLHEIM 2004; *Angelonia*, *Saintpaulia* PLASCHIL et al. 2003; *Plectranthus*, MONTEIRO 2002; *Hosta*, ZONNEVELD und VAN IREN 2000; *Petunia*, OLBRICHT 1998; *Verbena*, PLASCHIL 1997, *Pelargonium*; POHLHEIM und RÖSSEL, 1989). Die

Deutlichkeit, mit der sich erfolgreich behandelte *Pelargonium*-Sprosse im Bestand abzeichnen, übertraf jedoch die diesbezüglichen Erwartungen.

Als wesentlicher Einflussparameter auf die Zahl der registrierten Polyploidisierungserfolge erwies sich der weitere Kulturverlauf behandelter Pflanzen. *Pelargonium x zonale* besitzt ein Verzweigungssystem, in dem vegetative Sprosse regelmäßig in einer terminalen Infloreszenz enden und lateral von einer Seitenknospe übergipfelt werden (in RÖSSEL 1990). Gleichzeitig existieren in allen Blattachsen ruhende Meristeme, die, insbesondere bei den starkwüchsigen diploiden Sorten, zunächst keine Seitentriebe hervorbringen. Unscheinbare polyploide Sektoren gelangen möglicherweise erst nach einem Rückschnitt in aktivierte Gewebebereiche und werden dann phänotypisch auffällig. Nach Kolchizinierungen von *Malus* konnte DERMEN (1952) noch sieben Jahre nach der Behandlung eine sektorale Polyploidisierung dokumentieren. TILNEY-BASSETT (1986) fasst zusammen: „...any success with the initial colchicine treatment was greatly enhanced by the skill of the experimenter in recognizing and selecting the new polyploid areas and encouraging their growth over a period of one to several years.“

Der gärtnerischen Praxis kann der Rückschnitt, bzw. die Anregung von Verzweigungen in Verbindung mit einer längerfristigen Beobachtung des Bestandes im Anschluss an eine Trifluralinbehandlung empfohlen werden. Erfolgreiche Behandlungsvarianten sind neben der Wirkstoffkonzentration primär vom Untersuchungsobjekt selbst abhängig (Lage der Meristeme in den Knospen, Verzweigungsmodus etc.). Daneben wird chemischen Additiven, wie z.B. DMSO oder Tween ein maßgeblicher Einfluss auf den Behandlungserfolg beigemessen (RAO und SUPRASANNA 1996).

Es wird deutlich, dass ein Vergleich optimaler Wirkstoffkonzentrationen sowie Applikationsformen ausschließlich in Parallelversuchen möglich ist. Angaben anderer Autoren hinsichtlich getesteter Konzentrationsspektren können nur als Anhaltspunkte in der Versuchsplanung gelten. Die überlegene Wirksamkeit von Dinitroanilinen im Vergleich zu Kolchizin zeichnet sich jedoch auch in weiteren Arbeiten ab (ZLESK et al. 2005, EECKHAUT et al. 2002, RAMULU et al. 1991).

Die Entstehung von Cytochimären nach Polyploidisierungsversuchen auf somatischer Ebene kann als Regelfall betrachtet werden. TILNEY-BASSETT fasst bereits 1986 25 Taxa mit induzierter ploidiechimärischer Konstitution zusammen, die Liste ließe sich heute umfassend erweitern (z.B. *Petunia*, *Angelonia*, *Pelargonium*, OLBRICHT et al. 2006, *Rosa ssp.*, ZLESK et al. 2005; *Alocasia*, THAO et al. 2003).

Klone mit farbdefekter tetraploider L2 wurden für den kombinationszüchterischen Ansatz selektiert. Die aus der Valenzerhöhung der zweiten apikalen Schicht resultierende Blütenvergrößerung bildet in Kombination mit den stark verbreiteten Blatträndern von xTD-Formen keine gärtnerisch brauchbare Konstellation. Valenzerhöhungen in der L1 bzw. der L3 können jedoch gartenbaulich wertvolle Varianten bereits in der behandelten Generation hervorbringen. Die beeindruckende Stabilität von Cytochimären ermöglicht prinzipiell deren Verwendung in der Praxis (*Hosta*, ZONNEVELD und VAN IREN 2000; *Sansevieria*, POHLHEIM 2004).

Tetraploide Epidermis-Sektoren konnten über die Vermessung von Stomata sicher erfasst werden. Die hier ermittelte Größenrelation von 1:1,41 (diploid:tetraploid) wurde vergleichbar auch von CRAMER (1999) publiziert (dort: 1:1,37).

Phänotypisch zeichnet sich die einzige abvermehrte Variante mit tetraploider L1 gegenüber der Ausgangsvariante 'Contrast' durch vergrößerte Blüten aus (12 %, signifikant, T-Test). Im Hinblick auf eine markante Erweiterung variegater *Pelargonium*-Sortimente sind L1-tetraploide Varianten jedoch züchterische Sackgassen. Weder ist von ihnen eine wesentliche Modifikation des Sortenhabitus zu erwarten, noch kann mit ihnen kombinationszüchterisch auf tetraploidem Level weitergearbeitet werden.

Schwierigkeiten bereitete die Ploidiebestimmung L3-bürtiger, internaler Gewebe. Nach Trifluralinbehandlung hervorgegangene Schmalrandvarianten konnten bislang cytologisch noch nicht exakt eingeordnet werden. Nach Abvermehrung des Materials sollten Wurzelspitzenpräparate Rückschlüsse auf die L3 zulassen, auf die nach BATESON (1916) adventive Wurzeln in der Regel zurückgeführt werden können. Histologisch konnten im Laubblatt vergrößerte Zellen in typischen L3-bürtigen Lagen nachgewiesen werden. Jedoch konnten die Zellgrößen zunächst nur in Relation zu typischerweise L2-bürtigen Geweben bewertet werden. Es ist unklar, inwiefern die zu erwartenden stark gestreuten Messwerte für Zellen des Schwammparenchyms Aussagen auf quantitativer Ebene zulassen. Generell kann nicht ausgeschlossen werden, dass auffallend schmale Blattränder auf zusätzliche Defektmutationen in der L2 zurückgeführt werden müssen, wobei allerdings bereits bei Abschluss der Bonituren absehbar war, dass die gewonnenen „L3“-Varianten wesentlich größere und festere Laubblätter als ihre diploiden Vorläufer besitzen.

Die Entstehung von Schmalrandvarianten auf diploider Ebene konnte im Rahmen dieser Arbeit (die sukzessive Herausbildung zweier neuer Varianten spricht gegen eine spontane L3-Polyploidisierung) sowie von STEWART et al. (1974) und IMAI (1936) dokumentiert werden. Wachstumsgehemmte weiße L2-Deszendenzten provozieren sowohl bei den Varianten aus 'Sophie Dumaesque' als auch bei der tetraploiden Sorte 'Melosilver' atypische L1-Beteiligungen am Laubblattaufbau. Vergleichbare Aufspaltungen am Laubblattrand sind bei den Trifluralin-induzierten Varianten nicht zu beobachten. Auch die parallele Entstehung mehrerer „L3“-Varianten nach Polyploidisierungsversuchen deutet auf eine Valenzerhöhung der apikalen L3-Komponente. In Sprossscheitellängsschnitten bleiben Zellen der L2 in ihrer Größe deutlich hinter L3-Vertretern zurück. Es ist jedoch nicht klar auszumachen, ob es sich hierbei um Wechselwirkung einer normalwüchsigen L3 auf gehemmte L2-Zellen handelt oder ob eine tetraploide L3 Druck auf die Außenkomponenten ausübt und damit eine Abflachung hervorruft.

Die Prüfung der entstandenen weißgrünen DDT-Varianten hinsichtlich ihrer gärtnerischen Verwendbarkeit erscheint lohnend. Mit ihren vergleichsweise schmalen Blatträndern geht bei erster Betrachtung eine erhöhte Toleranz gegenüber abiotischen Einflussfaktoren einher. Nekrotische Verfärbungen nach Spritzwassereinwirkung wurden kaum beobachtet. Im Erscheinungsbild wirken die Schmalrandvarianten etwas dunkler, die rötliche Zonierung der Trikolour-Formen überlagert weitgehend grüne Blattpartien. Das Verzweigungsverhalten und die generelle Wüchsigkeit der entstandenen Varianten kann erst nach Abvermehrung in Vergleichsprüfungen bewertet werden. Es muss festgehalten werden, dass DDT-Varianten ein züchterisches Alleinstellungsmerkmal besitzen, das im Hinblick auf die Verwertung von Sortenrechten interessant ist.

Im Untersuchungszeitraum gelang es nicht, Varianten der Konstitution TTT nachzuweisen. Die Behandlungsergebnisse zeigen, dass die (vermutlichen) Polyploidisierungen der L3 insgesamt

seltener stattfanden als die nachgewiesenen Valenzerhöhungen in der L2. Die Kombination paralleler Mutationen im Sprossscheitel muss als Zufallsprozess betrachtet werden, der maßgeblich vom Verzweigungssystem der Testpflanzen beeinflusst wird. Auch die von TILNEY-BASSETT (1986) zusammengestellte Liste nachgewiesener Cytochimären erlaubt keine Rückschlüsse auf bevorzugte Polyploidisierungserfolge in Abhängigkeit von der Zelllage im geschichteten Sprossscheitel.

4.8 Hybridvariegation

Nach reziproken Kombinationen einer *P. zonale* Wildartvariante ('Roseum') mit den *P. x zonale*-Sorten 'Stadt Bern' und 'Trautlieb' konnten METZLAFF et al. (1982) bastardgescheckte Nachkommenschaften dokumentieren. Aus den Kreuzungen auf diploider Ebene ('Trautlieb': $2n=2x=18$, BADR und HORN 1971a) gingen neben homohistischen Sprossen alle sechs möglichen periklinalchimärischen Varianten hervor. Restriktionsmuster der Plastiden-DNA farbmarkierter Sprosse belegten für ausbleichende Chloroplasten in der F1 den Sorten-Ursprung. Die Verwendung von 'Stadt Bern' als Mutterpflanze brachte einen erheblich höheren variegaten Output in der F1 (36 %) verglichen mit dem Einsatz der Variante als Pollenspender (19 %). Die publizierte Abbildung (METZLAFF et al. 1982, Seite 247) zeigt einen weitgehenden Farbverlust der Sortenplastiden in einer variegaten F1-Pflanze.

Kombinationen aktueller Sorten mit *Pelargonium zonale* 4x erbrachten im Rahmen der vorliegenden Arbeit den Nachweis von Bastardvariegationen auf tetraploider Ebene. Der kumulative Vergleich reziproker Paarungen belegt einen markanten Einfluss der Kreuzungsrichtung auf die Zusammensetzung der F1. Die Verwendung aktueller Sorten als Mutterpflanzen bringt deutlich mehr farbdefekte F1-Sämlinge (variegate und hellgrüne: 91 %) hervor, als der umgekehrte Fall (30 %).

Auf diploider Ebene wurde ein karyogenetischer Einfluss auf die extranukleäre Konstitution der F1 nach biparentalen Kreuzungen nachgewiesen (AMOATEY und TILNEY-BASSETT 1994, TILNEY-BASSETT et al. 1992). Unabhängig davon konnte ein Anteil von über 80 % paternalen Nachkommen nach *Pelargonium*-Kreuzungen auf diploidem Niveau niemals registriert werden. Die Ergebnisse der Kreuzungen auf tetraploider Stufe (3.3) unterstreichen darüber hinaus mit einer Ausnahme (grün x 'Contrast 4x') den prävalenten Einfluss der Plastidenkomponente der Mutterpflanze auf die Farbverteilung in der F1. In Übereinstimmung mit den Befunden von METZLAFF et al. (1982) kann der massive Anteil hellgrüner Sämlinge nach Kreuzungen Sorte x Art (4x) also mit hoher Wahrscheinlichkeit auf ausbleichende Plastiden der mütterlich verwendeten Hochleistungssorten zurückgeführt werden.

Der Ursprung der ausbleichenden Plastidensorte ist aus praktischen Gesichtspunkten von übergeordneter Bedeutung. Nur wenn farbveränderte Plastiden auf Wildtypen zurückgeführt werden können, machen Rückkreuzungsprogramme mit aktuellen Sorten einen Sinn. Die züchterische Weiterarbeit mit dem geschaffenen tetraploiden Material erscheint aus diesem Blickwinkel nicht sinnvoll. In Rückkreuzungen mit aktuellen Sorten muss das Wiederergrünen der „Hochleistungsplastiden“ erwartet werden. Umgekehrt sollte die Verwendung der beiden gesicherten Formen mit chlorophylldefekter L2 in Kreuzungen mit der tetraploiden Wildartvariante

verstärkte Bleicheffekte (s.u.) hervorrufen. Diesbezügliche Kreuzungsansätze stehen jedoch noch aus.

Kreuzungen auf diploider Ebene brachten bereits in der F1 weitgehende Chlorophyllverluste in Folge von Kern-Plasma-Wechselwirkungen. Dagegen zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse einen nur schwachen Ausbleichungseffekt. Auf tetraploidem Level liegen nach einer ersten Kreuzung noch jeweils Allelpaaire der Elternpflanzen in der Nachkommenschaft vor. Nach BADR und HORN (1971b) deuten ausgeprägte Multivalentbildungen in der Meiose auf einen autopolyploiden Charakter tetraploider *Pelargonium*-Sorten. Es ist demnach denkbar, dass nach Kreuzungen auf tetraploider Ebene in der F1 noch Sorten-Allele in einer Kombination vorliegen, die den vollständigen Farbverlust korrespondierender Plastiden verhindern. Hinweise auf einen graduell ausgeprägten Chlorophyllverlust liefern auch die Kreuzungen mit der hybridvariegaten Periklinalchimäre, die aus Dresden bezogen wurde (zu der Variante existieren analoge Vertreter, so dass ein mutativer Entstehungshintergrund ausgeschlossen werden kann; pac® Elsner Jungpflanzen, persönliche Kommunikation). Die schwachen Farbkontraste der auf *P. articulatum* zurückzuführenden Variante erinnern an die oben beschriebenen Muster. Weitere (Rück-)Kreuzungen mit aktuellen Hochleistungssorten führten zu einem belichtungsunabhängigen Farbtyp, der sektorial auch in der F2 (der eigenen Kreuzungen) beobachtet werden konnte. Die prinzipielle Eignung von Hybridvariegationen zur Entwicklung von Laubblattvarianten auf tetraploider Ebene gilt damit als bewiesen. Der tetraploide Zustand des Versuchsmaterials ermöglicht jedoch offenbar graduelle Farbabstufungen je nach Allelkonfiguration im Zellkern. Intersektionale Kreuzungen innerhalb der Gattung *Rhododendron* lieferten ebenfalls Belege für den Einfluss der Ploidiestufe auf Kern-Plasma-Wechselwirkungen. Die Verwendung tetraploider Mutterpflanzen verhinderte das Ausbleichen mütterlicher Plastiden in der F1 (SAKAI et al. 2004).

Anders als in den Kreuzungen mit *P. zonale* 4x wird der Ursprung ausbleichender Plastiden bei *P. articulatum* x *P. x zonale*-Kombinationen in der verwendeten Wildart vermutet. Nur in der Kreuzungsrichtung hellgrün x grün (Sorte) konnten in der F1 variegata Nachkommen gewonnen werden. Chlorophyllvarianten auf der Basis von *articulatum*-Plastiden sind demnach züchterisch verwertbar. Nach Rückkreuzungen mit dem aktuellen Sortiment sind Kern-Plasma-Kombinationen, die das Ergrünen der *articulatum*-Plastiden ermöglichen, unwahrscheinlich, da mit der zunehmenden Verdrängung von *articulatum*-Allelen aus den Hybridgenomen die offenbar notwendige karyogenetische Basis für die Ergrünung der korrespondierenden Plastiden wegfällt.

P. zonale und *P. articulatum* gehören zum verwandtschaftlichen Umfeld der *P. x zonale*-Hybriden, wobei die Publikationen von BAKKER et al. (2000) sowie JAMES et al. (2004) es erlauben, über Kreuzvergleiche eine sehr enge phylogenetische Beziehung der zwei Species abzuleiten. Die auf molekulargenetischer Ebene gewonnenen Erkenntnisse zum Verwandtschaftsgrad der beiden Arten liefern bislang keine Erklärungen für das gegensätzliche Verhalten von *P. zonale*- und *P. articulatum*-Plastiden in Kombinationen mit modernen Sorten.

Nach Kreuzungen von *P. zonale* und *P. inquinans* konnte POHLHEIM (1986) hybridvariegata Sämlinge gewinnen. Aus den Farbverteilungen der reziproken Kreuzungen leitet er ab, dass die

ausbleichende Plastidensorte auf *P. inquinans* zurückzuführen ist, das heißt *P. inquinans* verhält sich in Kombinationen mit der Wildart *P. zonale* wie die aktuellen *P. x zonale*-Sorten. Restriktionsanalysen von Plastiden-DNA rücken *P. inquinans* in die unmittelbare verwandtschaftliche Nähe von *P. x zonale* (JAMES et al. 2004). Offenbar ist die genetische Balancierung zwischen Kern und Plasma hochgradig spezifisch, so dass selbst (Hybrid-)Kerne eng verwandter Arten Disharmonien hervorrufen können, die zu Chlorophyllverlusten führen.

METZLAFF et al. 1981 weisen auf Ebene der Plastiden-DNA wesentliche Unterschiede zwischen den *Pelargonium*-Arten *P. roseum*, *P. radula*, *P. peltatum* und *P. fragrans* nach. Von den getesteten Formen zeigte nur *P. roseum* eine nähere phylogenetische Verwandtschaft zu *P. x zonale*-Hybriden. *P. peltatum* wird von JAMES et al. (2004) der Sektion *Ciconium* zugeordnet und ist mit *P. x zonale* kombinierbar. Kreuzungen von *P. peltatum* und *P. x zonale* 'Mme Buchner' brachten auf diploider Ebene Nachkommen, die von COFFIN und HARNEY (1978) wie folgt beschrieben wurden: „...new shoots are pale yellow. On expansion the leaves may become green and mottled with white spots. Only one plant started to produce normal green shoots.“ Die geschilderten Variegationen deuten auf Kern-Plasma-Wechselwirkungen, die in Kreuzungspopulationen von *P. x peltatum* in der züchterischen Praxis nicht selten beobachtet werden (pac® Elsner Jungpflanzen, persönliche Kommunikation). Innerhalb der Gattung *Pelargonium* sind farbdefekte Nachkommenschaften auch für *P. denticulatum* x *P. filicifolium*-Kreuzungen dokumentiert (SMITH 1915). Die kurze Darstellung von SMITH liefert dabei bereits Hinweise auf abgestufte Farbverluste auch auf diploider Ebene. Erst in der F2 werden albinotische Typen beschrieben, während in der F1 nur eine „slight variegation“ registriert wurde.

Mit der molekulargenetisch nachgewiesenen Diversität von *Pelargonium*-Plastomen und der hochgradigen interspezifischen Kombinierbarkeit innerhalb der Gattung sind die Voraussetzungen für die Synthese hybridvariegater Laubblattmuster prinzipiell gegeben. HORN (1994) wertet zahlreiche sektionsübergreifende, interspezifische Kreuzungen innerhalb der Gattung *Pelargonium* aus. Leider wurden hybridvariegata Sämlinge in der umfangreichen Studie nicht dokumentiert. In von CHOW und HARNEY (1970) durchgeführten Kreuzungsarbeiten mit *P. x zonale*, *P. zonale*, *P. inquinans* und anderen Formen fanden Laubblattmerkmale ebenfalls keine Berücksichtigung.

Herkömmlich ist das Auftreten von Hybridvariegationen, wie sie für *Acacia*, *Hypericum*, *Oenothera*, *Pelargonium*, *Rhododendron*, *Silene*, *Geranium* und *Medicago* nachgewiesen werden konnten, an Kreuzungskombinationen mit biparentalem Erbgang gebunden (in KIRK und TILNEY-BASSETT 1978). In Gattungen mit uniparentalem Erbgang zeigen sich (Hybrid-)Kern/Plasma-Unverträglichkeiten in Form der sogenannten Bastardbleichheit.

Biotechnologische Verfahren erlauben es, den Kreis kombinierbarer Plasmavarianten auch auf sexuell nicht kompatible Gattungen zu erweitern. „Reziproke“ Kern-Plasma-Kombinationen von genetisch tiefgehend untersuchten Arten liefern erste Hinweise auf molekulargenetische Hintergründe von Hybridvariegationen/-bleichheiten.

Cybriden mit *Atropa*-Kern und *Nicotiana*-Plastom weisen eine ausgeprägte Inkompatibilität auf, resultierend in weißen Pflanzen. Die umgekehrte Kombination hingegen ergrünt vollständig. Sequenzunterschiede ließen sich insbesondere in PEP-codierenden Bereichen der Plastiden ausmachen (4.6). Auf der Ebene der Transkription sind offenbar Wechselwirkungen dieser

Regionen mit kerncodierten Faktoren für Kern-Plasma-Unverträglichkeiten mit verantwortlich. Daneben wird das kerncodierte „mRNA-editing“ im Plastom für Chlorophylldefekte verantwortlich gemacht. Tabak verfügt auf Grund seiner Entstehungsgeschichte als allotetraploide Pflanze im Zellkern über 2 genetische Systeme, die in Wechselwirkung mit dem Plastom wirken können. Das Ergrünen von *Atropa*-Plastiden im *Nicotiana*-Hintergrund wird auf die Existenz von Genen zurück geführt, die in Bezug auf das eigentliche Tabak-Plastom nicht mehr zur Wirkung kommen (SCHMITZ-LINNEWEBER et al. 2005, HERRMANN et al. 2003).

Eine molekulargenetische Analyse zu Ursachen von Kern-Plasma-Inkompatibilitäten innerhalb der Gattung *Oenothera* stellt HUPFER (2002) vor. Seine Untersuchungen münden in der Aussage: „Es zeichnet sich ein Bild ab, in dem jede inkompatible Genom/Plastom-Kombination auf andere Ursachen zurückzuführen ist.“

Modernen Hochleistungssortimenten geht nach Kreuzungen mit züchterisch unbearbeiteten Wildarten natürlich ein großer Teil ihrer Werteigenschaften verloren. Aufwändige Rückkreuzungen mit Segregationen zu L2-Varianten in jeder Generation machen die Nutzung von Hybridvariegationen in der Pflanzenzüchtung zu einem arbeitsintensiven Unterfangen. Aktuell sind Kern-Plasma-Wechselwirkungen ausschließlich Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen, ein Blick in die Vergangenheit legt jedoch die unbewusste Nutzung von Hybridvariegationen in der Pelargonienzüchtung nahe.

Die Frage, inwiefern die rasche Entstehung des variegaten *Pelargonium*-Sortiments Anfang des 19. Jahrhunderts auf interspezifische Kreuzungskombinationen zurückgeführt werden kann, thematisierten zuletzt METZLAFF et al. (1982). Die Sorte 'Mrs Pollock' wird von GRIEVE (1868) auf einen Sport an 'Golden Chain' zurückgeführt (die Bezeichnung „Sport“ wird von GRIEVE wie heute üblich verwendet). Für den Klon konnte ein fehlendes Protein des Chlorophyll-Protein-Komplex` I als Ursache für den Farbdefekt in der L2 ausgemacht werden (HERRMANN und HAGEMANN in STEINER et al. 1988), womit eine Plastidenmutation mit autonomer Auswirkung auf den Chlorophyllgehalt als gesichert gelten kann. CRAMER (1907) zitiert einen Bericht, nach dem an der Sorte 'Sophie Dumaesque' eine Knospensvariante mit weißrandigen Blättern erschien. Es wird deutlich, dass es heute, in Anbetracht des beträchtlichen Alters vieler *Pelargonium*-Laubblattvarianten, auch mit molekularbiologischen Arbeitstechniken schwierig sein dürfte, die ursprüngliche genetische Basis von Chlorophylldefekten in jedem Fall eindeutig zu klären. Für 'Flower of Spring' konnten JAMES et al. (2004) keine plastidären Restriktionsdimorphismen zwischen grünen und weißen Gewebekomponenten nachweisen, wobei die verwendete Methode nur größere Deletionen bzw. Umlagerungen auflösen kann. Der Chlorophyllverlust der Variante 'Mrs Parker' wird auf Plastiden zurückgeführt, die zu einer autonomen Transkription offenbar nicht mehr in der Lage sind (STEINER et al. 1988, BÖRNER et al. 1973 und 1972). Strukturelle Chlorophylldefektmutationen konnten von den Autoren bei dieser Variante nicht ausgemacht werden (METZLAFF et al. 1981 weisen „small, trifling differences“ ohne Bezug zu einem Chlorophylldefekt nach). Die oben dargestellten Befunde an *Nicotiana-Atropa*-Cybriden mit vollständigem Chlorophyllverlust machen deutlich, dass Kern-Plasma-Wechselwirkungen die plastidäre Transkription unterbinden können. Es darf angenommen werden, dass *Pelargonium*-Weißrandvarianten, für die keine strukturellen Chlorophylldefektmutationen nachgewiesen werden

können, aus interspezifischen Kreuzungen hervorgegangen sind. Von HAGEMANN (2000) als „Differenzierungsmutationen“ bezeichnete Balancierungen von Kern und Plasma wären dann Ausgangspunkte für die unbewusste züchterische Nutzung von Hybridvariegation in der Vergangenheit.

In diesem Zusammenhang lässt sich möglicherweise eine Erklärung für das unterschiedliche Entmischungsverhalten verschiedener Plasmotypen nach biparentalen Erbgängen finden. POHLHEIM (1986) deutet an, dass *P. x zonale* möglicherweise stärker auf *P. inquinans* zurückgeführt werden muss als bislang angenommen. Hybriden von *P. x zonale* und einer Plastomdefektvariante aus *P. inquinans* ('Mrs Pollock' bzw. 'Contrast') zeigen lang anhaltende Mischzustände, während Ribosomen-defiziente Chlorophyllvarianten, die möglicherweise auf Plastom-Differenzierungsmutationen (s.o.) zurückzuführen sind, rasch entmischen. Es ist denkbar, dass die Durchmischung elterlicher Plastiden und lang anhaltende Mischzustände den „innerartlichen“ Normalfall darstellen, während artfremde Plastiden bei der Zellteilung als solche „erkannt“ und im Mitoseverlauf „ausgesondert“ werden.

4.9 Somatische Kombination

Die Möglichkeit der somatischen Kombination ausgewählter Genotypen in periklinalchimärischer Konstitution muss als Erweiterung des methodischen Spektrums in der Zierpflanzenzüchtung unbedingt in Betracht gezogen werden (BURGE et al. 2002). Der nur bescheidene Umfang der (erfolglosen) *in vitro*-Veredelungsversuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit darf nicht darüber hinweg täuschen, dass dem Verfahren (auch *in situ*) grundsätzlich eine Bedeutung beizumessen ist, die in der züchterischen Praxis übersehen wird. Während die Veredlung von Pelargonien über Pfropfungen bzw. Okulationen als generell unproblematisch gilt (HARRISON 1974, GRIEVE 1868), sind Versuche zur Induktion von Pfropfheterohistoniten innerhalb der Gattung nicht belegt.

Die züchterische Nutzung pflanzensaftübertragbarer Agenzien über Veredelungen ist für *P. x peltatum* dokumentiert („Harlequin“-Serie, in LIS-BALCHIN 2002; „Zeebra“-Serie, www.elj.com/geranium/index.html).

In vitro belegen die Regenerationsversuche unter TDZ-Einfluss, dass neben der Adventivsprossinduktion an Hypokotylsegmenten massive Stauchungen apikaler Meristeme in Verbindung mit einer multiplen Lateral sprossbildung ausgelöst werden können (4.11.1). Die Anreicherung meristematischer Zellen über extreme Komprimierungen von Spitzenmeristemen wird auch für *in situ*-Kombinationen als aussichtsreich betrachtet, entsprechende Untersuchungen stehen jedoch aus. Es ist unklar, inwieweit die in der Praxis etablierten Stauchungsverfahren durch Dosiserhöhungen meristematische Cluster induzieren können.

Die Arbeit mit Laubblattvarianten ermöglicht die Selektion chimärischen Materials bereits in der vegetativen Phase. Aus Verwachsungsstellen regenerierende Sprosse können über die Farbmarkierung direkt auf ihren chimärischen Charakter überprüft werden. Nach Etablierung eines effektiven Systems zur somatischen Kombination von *Pelargonium*-Klonen eröffnen sich neue Horizonte. Hinsichtlich der Schaffung neuer Laubblattpattern sind Kombinationen diploider und tetraploider karyogenetischer wie plasmatischer Varianten denkbar. Möglicherweise ist auf diese Weise das Problem der massiven L2-Beteiligung am Laubblattrand zu bewältigen. Neben der

Stabilität der denkbaren cytochimärischen Konstrukte (die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind diesbezüglich vielversprechend) sind jedoch gartenbauliche und insbesondere blütenmorphologische Merkmale zu prüfen. Der Einfluss L2-bürtiger Gewebe am Aufbau der Blütenblätter in periklinalchimärischen Konstitutionen wie TDT/GWG unter Beteiligung alter, diploider Chlorophyllvarianten kann derzeit nicht abgeschätzt werden.

Die außergewöhnliche diploide Sorte 'Mr Wren' besitzt eine anthocyandefekte L1. Farbintakte L2-bürtige Zellen induzieren im Blütenblatt ein gefärbtes Binnenfeld (OLBRICHT et al. 2006, PLASCHIL et al. 2003). An Chlorophyllvarianten erprobte, reproduzierbare Methoden der somatischen Kombination sollten es ermöglichen auch vegetativ zunächst unauffällige Chimärenkomponenten zu kombinieren. Die Transplantation der 'Mr Wren'-L1-Komponente auf aktuelle Sorten verspricht Blütenmuster, die auf generativen Weg prinzipiell nicht realisiert werden können. Die Existenz der Variante 'Mr Wren TDD' (OLBRICHT et al. 2006) ermöglicht unter Umständen die Schaffung verschieden proportionierter Blütenmuster analog zu den hier beschriebenen Laubblattvarianten.

In der Literatur finden sich vereinzelt Belege für die somatische Kombination von Genotypen nach Cokultur isolierter Protoplasten (*Solanum*, *Lycopersicum*: LINDSAY et al. 1995, *Solanum*: BINDING et al. 1987). LINDSAY et al. (1995) geben eine Quote von 2,1 % chimärischer Regenerate an. Während das Verfahren erst nach Etablierung eines effektiven Protoplastenregenerationssystems zur Anwendung kommen kann, ist mit der Regeneration chimärischen Materials nach Kalluscokultur eine experimentelle Variante beschrieben, die auch für *Pelargonium* aussichtsreich erscheint (*Nicotiana*, CARLSON und CHALEFF 1974, 0,4 % chimärische Regenerate, MARCOTRIGIANO und GOUIN 1984, 0,3 %). NOZAWA und HIRATA (2002) beschreiben die Schaffung chimärischer Sprosse über *in vitro*-Anplattungen und anschließende Regenerationen aus Dünnschnitten. Der Anteil chimärischer Regenerate wird von den Autoren mit 26 % (!) beziffert. Für die somatische Kombination geprüfter *Pelargonium*-Genotypen kann jedoch nicht auf Sämlingsmaterial zurückgegriffen werden. Die Eignung jüngst entwickelter Regenerationsverfahren -basierend auf adultem Material- (HASSANEIN und DORION 2005, WINKELMANN et al. 2005, HAENSCH 2004a+b) zur Schaffung chimärischer Adventivsprosse kann erst nach experimenteller Überprüfung eingeschätzt werden.

4.10 *In vitro*-Kulturverfahren

4.10.1 Multiple Sprossregeneration

Ansätze mit dem Ziel der multiplen Sprossregeneration aus Sämlingen wurden in der Annahme verfolgt, dass zunächst sektorial ausgeprägte Variegationen nach biparentalen Erbgängen im Laufe der Sprossentwicklung nur selten periklinalchimärische Muster hervorbringen. Für Nachkommen aus 'Wilhelm Langguth 4x' und 'Flower of Spring 4x' in der Kombination w x g konnten jedoch jeweils über 20 % der ursprünglich vorhandenen Sämlinge zur Entwicklung von WR-Formen gebracht werden. Von den getopften Pflanzen mit weißen Gewebesegmenten konnten annähernd 50 % zu xWG-Varianten herangezogen werden. TILNEY-BASSETT (1963b) gibt für w x g-Kreuzungen auf diploider Ebene einen Anteil von nur 3,5 % periklinalchimärischer F1-

Pflanzen an (g x w: 4 %), wobei offenbar jegliche gärtnerischen Eingriffe unterblieben. In der kumulativen Darstellung von Kreuzungen mit 5 Weißrandvarianten werden Plasmotypen, die lang anhaltende Mischzustände hervorbringen, nicht gesondert erfasst. Dass derartige Kombinationen beobachtet wurden, geht jedoch aus der Tatsache hervor, dass bei Abschluss der Bonituren offenbar noch unentmischte Nachkommen vorhanden waren. Quantitative Angaben zur praktischen, gärtnerisch beeinflussten Anzucht von Periklinalchimären nach biparentalen Kreuzungen ließen sich in der gesichteten Literatur darüber hinaus nicht finden.

Die TDZ-Versuche im Rahmen dieser Studie sind vielversprechend hinsichtlich der Möglichkeit aus variegaten Sämlingen weiße und grüne Sprosse zu regenerieren. „Thin Layer“-Verfahren ermöglichen es prinzipiell, das zu regenerierende Ausgangsmaterial selbst auf kleinere Hypokotylsegmente zu reduzieren (CROKE und CASSELLS 1997, GILL et al. 1993). Bewurzelung und Freisetzung TDZ-induzierter Sprosse wurden für juveniles *Pelargonium*-Material bereits häufiger beschrieben (Zusammenfassung: MITHILA et al. 2001). Die erfolgreiche Selektion und Vereinzelung grüner Ammensprosse mit weißen Gewebepartnern ist für eine Gewächshauskultur zwingend. Die Ergebnisse der vorliegenden Versuche zeigen, dass bewurzelte Explantate mit beiden Komponenten *in situ* kultiviert werden können. Es kann davon ausgegangen werden, dass nach einer Optimierung des Vereinzelungs- und Freisetzungsverfahrens weiße und grüne Gewebekomponenten variegater Sämlinge weitestgehend gesichert werden können. Bei Blüte stehen weiße Triebe dann für Rückkreuzungen zur Verfügung. In Anbetracht der konventionell etablierbaren WR-Formen (50 % der variegaten Sämlinge) stellt sich jedoch die Frage, ob das experimentell aufwändige Verfahren empfohlen werden kann. Mit einer Ausweitung der Kreuzungsumfänge lässt sich die Zahl der selektierbaren Genotypen mit chlorophylldefekter L2 auch ohne den Einsatz biotechnologischer Verfahren leicht steigern.

Aufgesetzte Spitzenpräparate brachten multiple Sprossregenerate hervor, die sich von den Neubildungen an basalen und mittleren Hypokotylsegmenten deutlich unterschieden. In unmittelbarer Nähe der Sprossspitze konnte eine Häufung von Neutrieben beobachtet werden, die an den lateralen Austrieb extrem gestauchter Meristeme erinnerte. Ein Dimorphismus hinsichtlich der Natur von Sprossneubildungen unter TDZ-Einfluss wird auch von QURESHI und SAXENA (1992) berichtet. Die Autoren unterscheiden zwischen „Adventivspross“-Induktion und somatischer Embryogenese. Histogenetische Untersuchungen müssen zeigen, ob die meristemnah gebildeten Sprosse laterale Austriebe repräsentieren oder echte Adventivsprosse darstellen. Unter der Annahme bereits frühzeitig sektorial entmischter Zelldeszendenzen im Sämling ist die Beobachtung farbmarkierter Sektoren auf den gebildeten Sprossen ein Indiz für deren mehrzelligen Ursprung. Da multizelluläre Adventivsprossbildungen für *Pelargonium* jedoch nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden können (BERGANN und BERGANN 1959), ist damit kein eindeutiger Beleg erbracht.

Histogenetische Untersuchungen von Neubildungen an meristemfreien Hypokotylsegmenten liegen dagegen vor (HAENSCH 2004a). Die nicht nachweisbare bipolare Struktur der induzierten Regenerate machte nach Ansicht des Autors die Bezeichnung „somatic embryo-like structures“ (SELS) erforderlich.

Die Verdichtung meristematischer Zellen über die Induktion multipler Sprosse eröffnet

möglicherweise neue Wege im Hinblick auf die somatische Kombination ausgesuchter Genotypen (4.9).

4.10.2 Künstliche Mischzellen

Im Untersuchungszeitraum gelang es nicht, auf Basis der etablierten Zellsuspensionen reproduzierbare enzymatische Verdauungen zu gewährleisten. Die Ursachen liegen offenbar im physiologischen Zustand der Zellkulturen zum Zeitpunkt der Materialentnahme. Sterilkulturen von *Pelargonium*-Explantaten werden nicht selten durch massive Ausscheidungen phenolischer Exsudate erschwert (HILDEBRANDT und HARNEY 1988). Die auffällige Färbung verdauungsungeeigneter Filterkuchen nach der Probenentnahme legt auch für *Pelargonium*-Suspensionen Stressreaktionen des kultivierten Materials auf die Kulturbedingungen nahe. Von HILDEBRANDT und HARNEY empfohlene Verfahrensoptimierungen können sicherlich nicht ohne weiteres für die Flüssigkulturen übernommen werden. Der von den Autoren empfohlene Zusatz von organischen Säuren zu den Kulturmedien erwies sich jedoch auch in anderen *Pelargonium*-Kultursystemen als wirksam (HUTCHINSON und SAXENA 1996) und sollte in weiteren Untersuchungen Berücksichtigung finden.

Für phenolische Inhaltsstoffe konnten Hemmwirkungen auf cellulytisch wirkenden Enzyme nachgewiesen werden (SINEIRO et al. 1997). Es muss jedoch festgehalten werden, dass in erfolglosen Präparationen kaum unverdautes Zellmaterial beobachtet werden konnte. Vielmehr lagen überwiegend kleinste Zellfragmente vor, die auf enzymatische Prozesse zurückgeführt werden müssen. Die Ursachen für den Einfluss des Kulturzustandes auf den Verdauungserfolg müssen weitere Untersuchungen klären. Vorrangiges Ziel bleibt jedoch die Etablierung von *Pelargonium*-Suspensionskulturen mit konstant reproduzierbaren Eigenschaften. Im Hinblick auf die Homogenität des Ausgangsmaterials wird dem System, unabhängig von den vorliegenden Untersuchungen, eine prinzipielle Überlegenheit gegenüber Sprosskulturen eingeräumt. Untersuchungen von NASSOUR et al. (2003) zeigen, dass bereits die Blattanatomie von *Pelargonium-in vitro*-Kulturen einen wesentlichen Einfluss auf den Verdauungserfolg besitzt. Als Reaktion auf Luftfeuchte und Belichtung in Abhängigkeit von dem gewählten Kulturgefäßen zeigten sich deutliche Schwankungen in den Protoplastenerträgen. Den bei der Vermehrung von Sprosskulturen problematischen Phenolausscheidungen begegnen die Autoren durch den Zusatz von Aktivkohle in das Basismedium. Nach 5wöchiger Kultur stehen jeweils nur die ersten beiden unentfalteten Blätter eines Präparates als Ausgangsmaterial zur Verfügung. Nicht zuletzt arbeitswirtschaftliche Aspekte sollten die Favorisierung von Flüssigkulturverfahren nachvollziehbar machen.

Nach enzymatischer Lyse und Aufreinigung konnte im Rahmen dieser Arbeit Kallus auf Festmedien etabliert werden. Nach Überführung auf TDZ-haltige Medien wurden „green nodules“ beobachtet, die in übereinstimmender Form von anderen Autoren beschrieben wurden (CASSELLS 1979, CHEN und GALSTON 1967). Die histologische Untersuchung belegt eine Differenzierung von Xylem-Elementen innerhalb der grünlichen Gewebebereiche. Von CASSELLS (1979) veröffentlichte Querschnitte decken sich mit den hier dargestellten Befunden. Auf einem Zeatin-haltigen Medium konnte der Autor Sprossregenerationen in ca. 2 % der Kulturen

beobachten. Unter Zufuhr des Auxin-Transport-Inhibitors TIBA (2,3,5-Triiodobenzoic acid) wurden in 80 % aller Fälle Sprossregenerationen registriert. CHEN und GALSTON (1967) beschreiben Sprossregenerate aus „vascular nodules“ nach Überführung auf hormonfreie halbfeste Medien bzw. in Flüssigmedien.

Es liegt die Vermutung nahe, dass die Gewinnung von Sprossen aus teildifferenzierten Kallussen mit der Unterbindung bzw. Verdünnung endogener Auxinströme gefördert werden kann. Die Regeneration von Sprossen sollte dann auch nach dem hier beschriebenen Protoplastenkulturverfahren möglich sein.

Das züchterische Fernziel, die Schaffung und Regeneration künstlicher Mischzellen, ist an die möglichst rasche Differenzierung von Kern-Plasma-Konstrukten gebunden, nur so können somatische Segregationen vor einer Sprossregeneration verhindert werden. Neben dem Rückgriff auf Plasmotypen, die lang anhaltende Mischzustände gewährleisten (z.B. 'Contrast'), muss die Entwicklung von Zellkulturen mit hohem Regenerationspotenzial gefordert werden. Für verschiedene Taxa konnten in der Vergangenheit effektive Protoplastenkulturverfahren auf der Basis embryogener Suspensionen etabliert werden (z.B. *Cinnamomum*, DU und BAO 2005, *Rosa*, KIM et al. 2003). Die Etablierung vergleichbarer *Pelargonium*-Suspensionen gilt auch aus anderen Blickwinkeln als vielversprechender biotechnologischer Ansatz. Zu nennen sind hier insbesondere Verfahren zur Entwicklung künstlichen Saatgutes oder auch Transformationssysteme.

Die Kombination definierter Kern- und Plasmakomponenten wird derzeit nahezu ausschließlich auf dem Weg der asymmetrischen Zellfusion realisiert (LIU et al. 2005). Für die Gattung *Nicotiana* konnte eine Mikrofusionstechnik entwickelt werden, die es erlaubt Subprotoplasten, das heißt kernfreie Zellen mit einer definierten Anzahl Plastiden, gezielt mit ausgewählten Einzelzellen zu fusionieren. Die Überführung von nur 2 chlorophylldefekten Plastiden reichte aus, um variegated Pflanzen zu regenerieren (KOOP et al. 1992, EIGEL et al. 1991).

GILES et al. (1980) gelang die Überführung isolierter Chloroplasten in Protoplasten über elektrisch geladene Liposomvehikel. PEG- (Polyethylenglycol-) basierte Verfahren zur Fusion von Plastiden mit Pflanzenzellen werden vereinzelt beschrieben (DAVEY et al. 1976, BONNETT und ERIKSSON 1974, beide in CROSSWAY et al. 1986). Die Regeneration von Cybriden gelang in keinem der Ansätze.

Mikrochirurgische Organellentransplantationen blieben zunächst auf Mitochondrien beschränkt (VERHOEVEN und BLAAS 1988). Die Verwendung von Injektionsnadeln mit einem Durchmesser von 5µm machte dabei die teilweise Regeneration der Zellwand vor dem Eingriff notwendig. Erste Transplantationsexperimente mit Chloroplasten wurden ebenfalls von VERHOEVEN und BLAAS (1992) beschrieben. Dabei gelang es jedoch nicht, farbmarkierte Pflanzen zu regenerieren.

Kerntransplantationen sind aus anderen Organismenreichen bekannt und gehören dort seit über 50 Jahren zu den klassischen Experimenten (LORCH und DANIELLI 1953, GURDON 1977, beide in CROSSWAY et al. 1986). Auch nach Etablierung von Protoplastenregenerationssystemen wurden für höhere Pflanzen kaum vergleichbare Verfahren etabliert (DELAAT und BLAAS 1987). Offenbar macht der notwendige apparative Aufwand in Verbindung mit der hohen Arbeitsintensität mikrochirurgischer Arbeitstechniken die Methode nicht konkurrenzfähig zu den Fusionstechniken.

Experimentelle Ansätze mit dem Ziel der Manipulation meristematischer Zellen im Sprossscheitel fehlen ebenso. Für *Pelargonium x zonale* existieren praxisetablierte Sprossspitzen- bzw. Meristemkulturverfahren, die es erlauben, freigelegte Apikalmeristeme zu kultivieren. Es ist bislang ungeklärt, wie die teilungsaktiven Zellen an der Sprossspitze auf Mikroinjektionen reagieren. In Pollenschläuchen keimender *Pelargonium*-Mikrosporen konnten Proplastiden in größerer Zahl nachgewiesen werden (in BUTTERFASS 1979). Forschungsansätze zu Aufnahme und Transfer undifferenzierter Zellorganellen in somatische Gewebe sind mit farbmarkiertem, genetisch charakterisiertem *Pelargonium*-Material vielversprechend.

5 Zusammenfassung

Blattvariegate *Pelargonium* x *zonale*-Hybriden auf dem Leistungsstand aktueller Sorten können die bestehende Angebotspalette signifikant erweitern und sind wirtschaftlich interessant.

Weißbunte *Pelargonium*-Laubblattvarianten müssen auf der Basis periklinalchimärischer Konstitutionen geschaffen werden.

Ein kombinationszüchterischer Ansatz unter Ausnutzung biparentaler, extranukleärer Erbgänge erwies sich im Rahmen der vorliegenden Studie als vielversprechend. Kombinationen mit modernen, tetraploiden Sorten sind nur nach Polyploidisierung bestehender, diploider Laubblattvarianten durchführbar.

Die somatische Polyploidisierung existierender diploider Plastomvarianten kann über eine Trifluralin-Knospenbehandlung (0,075 %) effektiv erreicht werden. Aus etwa 8 % der behandelten Knospen gingen L2-tetraploide Sprosse hervor.

Polyploidisierungen der sporogenen L2 sind über veränderte Blattmusterproportionen deutlich erkennbar, Pollenmessungen können Behandlungserfolge verifizieren. xWG/xTD-Varianten besitzen größere Blüten, sind jedoch auf Grund ihrer extrem breiten hellen Laubblattränder gärtnerisch unbrauchbar.

Die fünf in Kreuzungen einbezogenen Plastomvarianten erwiesen sich auf tetraploider Ebene als kompatibel. Alle fünf Plasmotypen wurden in periklinalchimärischer Konstitution in der F1 etabliert. Bereits nach der ersten Kreuzung können Weißrandvarianten mit halbgefüllten Blüten selektiert werden, wie sie für tetraploide Hochleistungssortimente typisch sind. Die Plastome aus 'Contrast' und 'Hills of Snow' konnten in die F2 überführt werden.

Das Entmischungsverhalten heteroplastidischer Zygoten ist primär vom Plastidentyp abhängig.

In Kreuzungen auf tetraploider Stufe empfiehlt sich die Verwendung grüner Varianten als Pollenspender.

Rasch entmischende Plastomkombinationen können durch gärtnerische Eingriffe zu etwa 50 % in periklinalchimärische Formen überführt werden. Die TDZ-induzierte, multiple Sprossinduktion an Hypokotylsegmenten erlaubt die Etablierung weißer Sprosse in Kombination mit grünen Ammensprossen. Weiße Sprosse können in (Rück-)Kreuzungen Verwendung finden.

Auf tetraploider Ebene zeichnen sich ploidiegekoppelte Histogeneseprozesse ab, die zu veränderten Blattmusterproportionen führen. Die gärtnerische Nutzung von Weißrandvarianten ist nur vielversprechend, wenn es gelingt, Klone mit wuchsgehemmter L2 zu entwickeln. Auf diploider Ebene konnte die spontane Entstehung von zwei Schmalrandvarianten aus einer Kreuzung mit 'Sophie Dumaesque' beobachtet werden.

Nach Trifluralinbehandlung entstandene Schmalrandvarianten werden auf die Polyploidisierung der internalen L3 zurückgeführt, wobei cytologische Nachweise noch ausstehen. Der gärtnerische Wert

dieser Typen muss geprüft werden. L1-tetraploide Pflanzen zeichnen sich durch leicht vergrößerte Blüten bei unverändertem Laubblattmuster aus.

Kreuzungen mit *P. zonale* und *P. articulatum* führten auf tetraploider Ebene zu Hybridvariegationen. Die Herkunft der ausbleichenden Plastidensorte ist für den weiteren Züchtungsprozess entscheidend. *P. articulatum*-Plastiden zeigten nach (Rück-)Kreuzungen mit aktuellen Sorten einen zunehmenden Farbverlust.

NMH-behandelte Sämlinge brachten keine Farbvarianten hervor, die mit existierenden Formen konkurrieren können. Behandlungsart und -intensität müssen optimiert werden.

Über Antibiotika-Behandlungen konnten keine stabilen Chlorophyllverluste generiert werden. Die prinzipielle Eignung des dem Ansatz zugrunde liegenden theoretischen Modells muss kritisch hinterfragt werden.

Es konnten *Pelargonium*-Kallussuspensionen etabliert und charakterisiert werden. Die nicht stabil reproduzierbare Gewinnung von Protoplasten aus den Zellkulturen wird auf wechselnde physiologische Zustände des Ausgangsmaterials zurückgeführt. Im Anschluss an eine Protoplastenphase gewonnener Kallus zeigte unter TDZ-Einfluss Gefäßdifferenzierungen.

Somatische Kombinationen über *in vitro*-Veredelungen blieben erfolglos. Dem Verfahren wird jedoch im Hinblick auf die Gewinnung chimärischer Laubblatt- sowie Blütenfarbvarianten ein bislang ungenutztes Potenzial eingeräumt.

6 Literaturverzeichnis

- ABDEL-WAHAB, O. und TILNEY-BASSETT, R. (1981) The Role of Plastid Competition in the Control of Plastid Inheritance in the Zonal *Pelargonium*, *Plasmid* 6: 7-16
- ABO EI-NIL, M. und HILDEBRANDT, A. (1976) Cell wall regeneration and colony formation from isolated single geranium protoplasts in microculture, *Canadian Journal of Botany* 54: 1530-1534
- ADAMS, F. (1971) Anatomy and Morphology, in: MASTALERZ, J: *Geraniums – A Penn State Manual*, 3-12, Pennsylvania Flower Growers, University Park, USA
- ALLISON, L., SIMON, L. und MALIGA P. (1996) Deletion of *rpoR* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants, *EMBO Journal* 15: 2802-2809
- ALMOUSLEM, B. und TILNEY-BASSETT, R. (1989) Inheritance of Red-spotted Petals and Golden Leaves in Zonal *Pelargonium*, *HortScience* 24: 501-502
- ALMOUSLEM, B. NASSER, N. und TILNEY-BASSETT, R. (1991) Complementary genes for red flower colour in zonal pelargoniums, *Journal of Horticultural Science* 66: 651-659
- AMOATEY, H. und TILNEY-BASSETT, R. (1993) Multiple alleles and the control of leaf zonation patterns in zonal pelargoniums, *Journal of Horticultural Science* 68: 45-52
- AMOATEY, H. und TILNEY-BASSETT, R. (1994) A test of the complementary gene model for the control of biparental plastid inheritance in zonal pelargoniums, *Heredity* 72: 69-77
- ANONYM (2002) Trifluralin (Treflan) Herbicide Profile 2/85, PMEP Cornell University, USA
- ANONYM (2005) Land- und Forstwirtschaft, Fischerei – Landwirtschaftliche Bodennutzung und pflanzliche Erzeugung 2003, Statistisches Bundesamt, Fachserie 3, Reihe 3: 100
- BADR, M. (1971) Cytologische, genetische und züchterische Untersuchungen bei *Pelargonium zonale*-Hybriden, Dissertation, Technische Universität Hannover, D
- BADR, M. und HORN, W. (1971a) Genetische Untersuchungen an diploiden und tetraploiden *Pelargonium zonale*-Hybriden, *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 66: 203-220
- BADR, M. und HORN, W. (1971b) Cytologische Untersuchungen bei *Pelargonium zonale*-Hybriden, *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 66: 158-174
- BAE, C., ABE, T., NAGATA, N., FUKUNISHI, N., MATSUYAMA, T., NAKANO, T. und YOSHIDA, S. (2000) Characterization of a periclinal chimera variegated tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), *Plant Science* 151: 93-101
- BAGUST, H. (1988) *Miniature and dwarf Geraniums (Pelargoniums)*, Timber Press, Portland, USA
- BAKKER, F., CULHAM, A., DAUGHERTY, L. und GIBBY, M. (1999) A trnL-F based phylogeny for species of *Pelargonium* (*Geraniaceae*) with small chromosomes, *Plant Systematics and Evolution* 216: 309-324

- BAKKER, F., CULHAM, A., PANKHURST, C. und GIBBY, M. (2000) Mitochondrial and Chloroplast DNA-Based Phylogeny of *Pelargonium* (*Geraniaceae*), *American Journal of Botany* 87: 727-734
- BATESON, W. (1916) Root-Cuttings, Chimaeras and "Sports", *Journal of Genetics* 6: 75-80
- BAUR, E. (1909) Das Wesen und die Erblchkeitsverhältnisse der "Varietates albomarginatae hort." von *Pelargonium zonale*, *Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre* 1: 330-351
- BEECK, A. (1993) Immer aktuell: Pelargonien, *Schriften zur Förderung des Gartenbaus*, Georgi, Aachen, D
- BEHE, B. und NELSON, R. (1999) Consumer Preferences for Geranium Flower Color, Leaf Variegation, and Price, *HortScience* 34: 740-742
- BELEZKII, Y., RAZORITELEVA, E. und ZHDANOV, Y. (1969) Cytoplasmic Mutations Induced in Sunflower by N-Nitrosomethylurea, *Doklady Akademii Nauk SSSR* 168: 1425-1426
- BENGUS, Y. (1999) Decorative periclinal chimeras of *Weigela praecox* (LEMOINE) BAILEY created by chemical mutagenesis, *Mutation Breeding Newsletter* 44: 18
- BENNETT, M. (2004) Perspectives on polyploidy in plants – ancient and neo, *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 411-423
- BENNICI, A. (1974) Cytological analysis of roots, shoots and plants regenerated from suspension and solid *in vitro* cultures of haploid *Pelargonium*, *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 72:199-205
- BERGANN, F. (1962a) Über die Beteiligung des 'Dermatogens' an der Mesophyllbildung - Paradigmatische Schichtenverlagerungen an den Blättern albovariegater Periklinalchimären, *Wissenschaftliche Zeitschrift der Pädagogischen Hochschule Potsdam* 7: 75-86
- BERGANN, F. (1962b) Über den Nachweis zwischenzelliger Genwirkungen (Partnerinduktion) bei der Pigmentbildung in den Brakteen der Periklinalchimäre *Euphorbia pulcherrima* WILLD. „Eckes Rosa“, *Biologisches Zentralblatt* 81: 469-503
- BERGANN, F. (1967) Mutationschimären: Rohmaterial züchterischer Weiterbehandlung, *Umschau* 24: 71-79
- BERGANN, F. und BERGANN, L. (1959) Über experimentell ausgelöste vegetative Spaltungen und Umlagerungen an chimärischen Klonen, zugleich als Beispiele erfolgreicher Staudenauslese – I. *Pelargonium zonale* AIT. „Madame Salleron“, *Der Züchter* 29: 361-374
- BERGANN, F. und BERGANN, L. (1962) Über Umschichtungen (Translokationen) an den Sproßscheiteln periklinaler Chimären, *Der Züchter* 32: 110-119
- BHOJWANI, S. und RAZDAN, M: (1983) *Plant Tissue Culture – Theory and Practice*, Developments in Crop Science 5, Elsevier, Amsterdam, NL
- BINDING, H., WITT, D., MONZER, J., MORDHORST, G. und KOLLMANN, R. (1987) Plant cell graft chimeras obtained by co-culture of isolated protoplasts, *Protoplasma* 141: 64-73

- BLAKESLEE, A. und AVERY, A. (1937) Methods of inducing doubling of chromosomes in plants, *Journal of Heredity* 28: 393-411
- BOCK, R. und HAGEMANN, R. (2000) Extranuclear Inheritance: Plastid Genetics: Manipulation of Plastid Genomes and Biotechnological Applications, *Progress in Botany* 61: 76-90
- BONNETT, H., DJURBERG, I., FAJARDO, M. und GLIMELIUS, K. (1993) A Mutation causing Variegation and abnormal Development in Tobacco is associated with an altered Mitochondrial-DNA, *Plant Journal* 3: 519-525
- BÖRNER, T., KNOTH, R., HERRMANN, F. und HAGEMANN, R. (1972) Struktur und Funktion der genetischen Information in den Plastiden – V. Das Fehlen von ribosomaler RNS in den Plastiden der Plastommutante Mrs. Parker von *Pelargonium zonale* AIT., *Theoretical and Applied Genetics* 42: 3-11
- BÖRNER, T., HERRMANN, F. und HAGEMANN, R. (1973) Plastid Ribosome deficient Mutants of *Pelargonium zonale*, *FEBS Letters* 37: 117-119
- BORTZ, J. (2000) Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik, Springer, Berlin, D
- BÖTTGER, E., SPRINGER, B., PRAMMANANAN, T., KIDAN, Y. und SANDER, P. (2001) Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics, *EMBO Reports* 21: 318-323
- BURGE, G., MORGAN, E. und SEELYE, F. (2002) Opportunities for synthetic plant chimeral breeding: Past and Future, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 13-21
- BUTTERFASS, T. (1979) Patterns of Chloroplast Reproduction, Springer, Wien, A
- CAMPBELL, E., KORZHEVA, N., MUSTAEV, A., MURAKAMI, K., NAIR, S., GOLDFARB, A. und DARSI, S. (2001) Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase, *Cell* 104: 901-912
- CARLSON, P. und CHALEFF, R. (1974) Heterogeneous associations of cells formed *in vitro*, in: LEDOUX, L.: Genetic Manipulations with Plant Materials, 245-261, Plenum Press, New York, USA
- CARTER, A., CLEMONS, W., BRODERSEN, D., MORGAN-WARREN, R., WIMBERLY, B. und RAMAKRISHNAN, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics, *Nature* 407: 340-348
- CASSELLS, A. (1979) The Effect of 2,3,5-Triiodobenzoic Acid on Caulogenesis in Callus Cultures of Tomato and *Pelargonium*, *Physiologia Plantarum* 46: 159-164
- CASSELLS, A. und MINAS, G. (1983) Beneficially-infected and chimeral *Pelargonium*: Implications for Micropropagation by Meristem and Explant Culture, *Acta Horticulturae* 131: 287-297
- CASSELLS, A., MINAS, G. und LONG, R. (1980) Culture of *Pelargonium* hybrids from meristems and explants: chimeral and beneficially-infected varieties, in: INGRAM, D. und HELGESON, J.: Tissue Culture Methods for Plant Pathologists, 125-131, Blackwell, Oxford, GB

- CHANG, C., MOLL, B., EVENSON, K. und GUILTINAN, M. (1996) *In vitro* plantlet regeneration from cotyledon, hypocotyl and root explants of hybrid seed geranium, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45: 61-66
- CHEN, H. und GALSTON, A. (1967) Growth and Development of *Pelargonium* Pith Cells *in vitro* - II. Initiation of Organized Development, *Physiologia Plantarum* 20: 533-539
- CHITTENDEN, R. (1926) Studies in variegation. II *Hydrangea* and *Pelargonium*: With notes on certain chimerical arrangements which involve sterility, *Journal of Genetics* 16: 43-61
- CHITTENDEN, R. (1927) Vegetative Segregation, *Bibliographia genetica* 3: 355-442
- CHOW, T. und HARNEY, P. (1970) Crossability between a diploid *Pelargonium x hortorum* BAILEY cultivar and some of its putative ancestral species, *Euphytica* 19: 338-348
- CLARK, D. (1988) *Pelargoniums*, Collingridge, London, GB
- CLARK, D., RICHARDS, C., HILLOTI, Z., LIND-IVERSEN, S. und BROWN, K. (1997) Effect of pollination on accumulation of ACC synthase and ACC oxidase transcripts, ethylene production and flower petal abscission in geranium (*Pelargonium x hortorum* L.H. BAILEY), *Plant Molecular Biology* 34: 855-865
- CLIFFORD, D. (1970) *Pelargoniums – including the popular 'Geranium'*, Blandford Press, London, GB
- COFFIN, J. und HARNEY, P. (1978) Intersubgeneric Crosses within the Genus *Pelargonium*, *Euphytica* 27: 567-576
- CRAMER, C. (1999) Laboratory Techniques for Determining Ploidy in Plants, *HortTechnology* 9: 594-596
- CRAMER, C. und CRAIG, R. (1991) Hybridization between diploid and tetraploid *Pelargonium x hortorum* BAILEY, *HortScience* 26: 739
- CRAMER, P. (1907) Kritische Übersicht der bekannten Fälle von Knospenvariation, Haarlem, NL
- CROKE, J. und CASSELLS, A. (1997) Dark induction and genetic stability of somatic embryos of zonal pelargoniums (*Pelargonium x zonale* BAILEY), *Journal of applied Botany* 71: 119-124
- CROSSWAY, A., HAUPTLI, H., HOUCK, C., IRVINE, J., OAKES, J. und PERANI, L. (1986) Micromanipulation Techniques in Plant Biotechnology, *BioTechniques* 4: 320-334
- DAKER, M. (1966) "Kleine Liebling". A haploid cultivar of *Pelargonium*, *Nature* 211: 549-550
- DAKER, M. (1967) Cytological studies on a haploid cultivar of *Pelargonium*, and its colchicine-induced diploids, *Chromosoma* 21: 250-271
- DAKER, M. (1969) Chromosome number of *Pelargonium* species and cultivars, *Journal of the Royal Horticultural Society* 94: 346-353

- DAVEY, M., ANTHONY, P., BRIAN-POWER, J. und LOWE, K. (2005) Plant Protoplast Technology: Status and Applications, *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 41: 202-212
- DAVIDSON, D., PERTENS, E. und ARMSTRONG, S. (1987) Changes in frequencies of variegated leaves in NMU treated tobacco, *Theoretical and Applied Genetics* 73: 915-919
- DELAAT, A. und BLAAS, J. (1987) An improved method for protoplast micro-injection suitable for transfer of entire plant chromosomes, *Plant Science* 50: 161-169
- DENIS-PEIXOTO, L., CADIC, A. und RENOU, J. (1997) Interspecific crosses between *Pelargonium x hortorum* and *P. quinquelobatum* using embryo rescue and molecular characterization of hybrids by an endogenous *chs* probe, *Plant Breeding* 116: 177-180
- DERMEN, H. (1952) Polyploidy in the apple found seven years after colchicine treatment, *Journal of Heredity* 43: 7-8
- DERMEN, H. (1967) Colchipoity and Cytochimeras in the Study of Ontogenetic Problems, *Proceedings of the XVII International Horticultural Congress, Maryland, USA*, 2: 3-13
- DOYLE, B., LAWTON, D. und CASSELLS, A. (2000) Adventitious Regeneration in Root Culture of a Selection of *Pelargonium x hortorum* Cultivars: An Assessment of Caulogenic Potential and Genetic Stability, *Acta Horticulturae* 530: 225-230
- DU, L. und BAO, M. (2005) Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultured cells of *Cinnamomum camphora* L., *Plant Cell Reports* 24: 462-467
- DUMET, D., GRAPIN, A., BAILLY, C. und DORION, N. (2002) Revisiting crucial steps of an encapsulation/desiccation based cryopreservation process: importance of thawing method in the case of *Pelargonium* meristems, *Plant Science* 163: 1121-1127
- DUNBAR, K. und STEPHENS, C. (1991) Plant-Regeneration from Callus-Derived Protoplasts of *Pelargonium x domesticum*, *Plant Cell Reports* 10: 417-420
- EECKHAUT, T., SAMYN, G. und VANBOCKSTAELE, E. (2002) *In Vitro* Polyploidy Induction in *Rhododendron simsii* Hybrids, *Acta Horticulturae* 572: 43-49
- EIGEL, L. und KOOP, H. (1992) Transfer of defined numbers of chloroplasts into albino protoplasts by subprotoplast/protoplast microfusion: chloroplasts can be „cloned“, by using suitable plastome combinations or selective pressure, *Molecular and General Genetics* 233: 479-482
- EIGEL, L., OELMÜLLER, R. und KOOP, H. (1991) Transfer of defined numbers of chloroplasts into albino protoplasts using an improved subprotoplast/protoplast microfusion procedure: Transfer of only two chloroplasts leads to variegated progeny, *Molecular and General Genetics* 227: 446-451
- ELLIS, J., TAYLOR, R. und HUSSEY, P. (1994) Molecular Modeling Indicates that Two Chemically Distinct Classes of Anti-Mitotic Herbicide Bind to the Same Receptor Site(s), *Plant Physiology* 105: 15-18

- ERHARDT, W., GÖTZ, E., BÖDEKER, N. und SEYBOLD, S. (2002) Zander – Handwörterbuch der Pflanzennamen, Ulmer, Stuttgart, D
- FALK, J., SCHMIDT, A. und KRUPINSKA, K. (1993) Charakterization of Plastid DNA-Transcription in Ribosome-Deficient Plastids of Heat-Bleached Barley Leaves, *Journal of Plant Physiology* 141: 176-181
- FISCHER (2001) Fischer GmbH & Co. KG, Onlinekatalog: www.pelfi.de
- FLUHR, R. und CSÉPLO, A. (1986) Induction and Selection of Chloroplast-Coded Mutations in *Nicotiana*, *Methods in Enzymology* 118: 611-623
- FREARSON, E., POWER, J. und COCKING, E. (1973) The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts, *Developmental Biology* 33: 130-137
- FRIEDBERG, E. (1985) DNA-Repair, Freeman, New York, USA
- GALUN, E. und AVIV, D. (1986) Organelle Transfer, *Methods in Enzymology* 118: 595-611
- GAMBORG, O., MILLER, R. und OJIMA, K. (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells, *Experimental Cell Research* 50: 150-158
- GIBBY, M., ALBERS, F. und PRINSLOO, B. (1990) Karyological studies in *Pelargonium* sectt. *Ciconium*, *Dibrachya*, and *Jenkinsonia* (*Geraniaceae*), *Plant Systematics and Evolution* 170: 151-159
- GILES, K., VAUGHAN, V., RANCH, J. und EMERY, J. (1980) Liposome-Mediated Uptake of Chloroplasts by Plant Protoplasts, *In Vitro* 16: 581-584
- GILL, R., GERRATH, J. und SAXENA, P. (1993) High-frequency direct somatic embryogenesis in thin layer cultures of hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum*), *Canadian Journal of Botany* 71: 408-413
- GLÄSS, E. und MARQUARDT, H. (1968) Distribution and Localization of Induced Breaks on the Chromosomes of *Bellevalia romana*, *Molecular and General Genetics* 101: 307-316
- GRAZZINI, R., HESK, D., YERGER, E., COX FORSTER, D., MEDFORD, J., CRAIG, R. und MUMMA, R. (1995) Distribution of anarcadic acids associated with small pest resistance among cultivars of *Pelargonium x hortorum*, *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120: 343-346
- GRIEVE, P. (1868, Nachdruck 1977) A History of Ornamental Foliaged Pelargoniums, British *Pelargonium* and *Geranium* Society, London, GB
- GUO, F. und HU, S. (1995) Cytological evidence of biparental inheritance of plastids and mitochondria in *Pelargonium*, *Protoplasma* 186: 201-207

- HAENSCH, K. (2004a) Thidiazuron-induced morphogenetic response in petiole cultures of *Pelargonium x hortorum* and *Pelargonium x domesticum* and its histological analysis, Plant Cell Reports 23: 211-217
- HAENSCH, K. (2004b) Morpho-histological study of somatic embryo-like structures in hypocotyl cultures of *Pelargonium x hortorum* BAILEY, Plant Cell Reports 22: 376-381
- HAGEMANN, R. (1964) Genetik: Grundlagen, Ergebnisse und Probleme in Einzeldarstellungen, Beitrag 4: Plasmatische Vererbung, Fischer, Jena, D
- HAGEMANN, R. (1976) Plastid Distribution and Plastid Competition in Higher Plants and the Induction of Plastom Mutations by Nitroso-Urea-Compounds, in: BÜCHER, T., NEUPERT, W., SEBALD, W. und WERNER, S.: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria, 331-338, Elsevier, Amsterdam, NL
- HAGEMANN, R. (1982) Induction of plastome mutations by nitroso-urea-compounds, in: EDELMAN, M., HALLICK, R. und CHUA, N.: Methods in chloroplast molecular biology, 119-127, Elsevier, Amsterdam, NL
- HAGEMANN, R. (1992) Plastid Genetics in Higher Plants, in: HERRMANN, R.: Cell Organelles, 65-96, Springer, Wien, A
- HAGEMANN, R. (2000) Erwin Baur: (1875-1933); Pionier der Genetik und Züchtungsforschung; seine wissenschaftlichen Leistungen und ihre Ausstrahlung auf Genetik, Biologie und Züchtungsforschung von heute, Kovar, Eichenau, D
- HAGEMANN, R. und SCHOLZ, F. (1962) Ein Fall geninduzierter Mutationen des Plasmotypus bei Gerste, Der Züchter 32: 50-59
- HAGEMANN, R. und SCHOLZE, M. (1974) Struktur und Funktion der genetischen Information in den Plastiden. VII. Vererbung und Entmischung genetisch unterschiedlicher Plastidensorten bei *Pelargonium zonale* AIT., Biologisches Zentralblatt 93: 625-648
- HANSEN, N. und ANDERSEN, S. (1996) *In Vitro* Chromosome Doubling Potential of Colchicine, Oryzalin, Trifluralin, and APM in *Brassica napus* Microspore Culture, Euphytica 88: 159-164
- HARNEY, P. (1976) The Origin, Cytogenetics and Reproductive Morphology of the Zonal Geranium: A Review, HortScience 11: 189-194
- HARRISON, L. (1974) Grafting Methods, Geraniums Around The World (GATW) 12: 10-13
- HASSANEIN, A. und DORION, N. (2005) Efficient plant regeneration system from leaf discs of zonal (*Pelargonium x hortorum*) and two scented (*P. capitatum* and *P. graveolens*) geraniums, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 83: 231-240

- HAVAS, L. (1942) L'évolution graduelle d'anomalies morphologiques, y compris la polyplœdie, induites chez les *Pelargonium zonale* par inoculations répétées du *Bacterium tumefaciens*, Académie Royale de Belgique, Bulletin de la Classe des Sciences 5, 28: 318-340
- HEINHORST, S. und CANNON, G. (1993) DNA-Replication in Chloroplasts, Journal of Cell Science 104: 1-9
- HEINHORST, S., CHI-HAM, C., ADAMSON, S. und CANNON, G. (2004) The Somatic Inheritance of Plant Organelles, in: DANIELL, H. und CHASE, C.: Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles, 37-92, Springer, Dordrecht, NL
- HEIZMANN, P., HUSSEIN, Y., NICOLAS, P. und NIGON, V. (1982) Modifications of Chloroplast DNA During Streptomycin Induced Mutagenesis in *Euglena gracilis*, Current Genetics 5: 9-15
- HENTRICH, W. und BEGER, B. (1974) Untersuchungen über die mutagene Effizienz von N-Nitroso-N-Methylharnstoff bei *Saintpaulia ionantha* H. WENDL., Archiv für Züchtungsforschung 4:29-43
- HERRMANN, F. und HAGEMANN, R. (1971) Struktur und Funktion der genetischen Information in den Plastiden – III. Genetik, Chlorophylle und Photosyntheseverhalten der Plastommutante 'Mrs. Pollock' und der Genmutante 'Cloth of Gold' von *Pelargonium zonale*, Biochemie und Physiologie der Pflanzen 162: 390-409
- HERRMANN, F., MAIER, M. und SCHMITZ-LINNEWEBER, C (2003) Eukaryotic genome evolution: rearrangement and coevolution of compartmentalized genetic information, Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Science 358: 87-97
- HILDEBRANDT, V. und HARNEY, P. (1988) Factors affecting the release of phenolic exudate from explants of *Pelargonium x hortorum*, BAILEY 'Sprinter Scarlet', Journal of Horticultural Science 63: 651-657
- HORN, W. (1994) Interspecific Crossability and Inheritance in *Pelargonium*, Plant Breeding 113: 3-17
- HORST, R., SMITH, S., HORST, H. und OGLEVEE, W. (1976) *In vitro* regeneration of shoot and root growth from meristem tips of *Pelargonium x hortorum* BAILEY, Acta Horticulturae 59: 131-141
- HOSTICKA, L. und HANSON, M. (1984) Induction of plastid mutations in tomatoes by nitrosomethylurea, Journal of Heredity 75: 242-246
- HUPFER, H. (2002) Vergleichende Sequenzanalyse der fünf Grundplastome der Sektion *Oenothera* (Gattung *Oenothera*) – Analyse des Cytochrom-Komplexes, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, D
- HUTCHINSON, M. und SAXENA, P. (1996) Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes TDZ-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* BAILEY) tissue cultures, Plant Cell Reports 15: 512-515

- IMAI, Y (1936) Geno- and Plasmotypes of variegated *Pelargoniums*, *Journal of Genetics* 33: 169-195
- JAMES, C., BARRETT, J., RUSSELL, S. und GIBBY, M. (2001) A Rapid PCR Based Method to Establish the Potential for Paternal Inheritance of Chloroplasts in *Pelargonium*, *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 163-167
- JAMES, C., GIBBY, M., und BARRETT, J. (2004) Molecular studies in *Pelargonium* (*Geraniaceae*). A taxonomic appraisal of section *Ciconium* and the origin of the 'Zonal' and 'Ivy-leaved' cultivars, *Plant Systematics and Evolution* 243: 131-146
- JAMES, J. (2002) Cultivation and sales of *Pelargonium* plants for ornamental use in the UK and worldwide, in: LIS-BALCHIN, M. *Geranium and Pelargonium*, 80-92, Taylor and Francis, London, GB
- JANSEN, R. und 14 Coautoren (2005) Methods for obtaining and analyzing chloroplast genome sequences, *Methods in Enzymology* 395: 348-384
- KAMEYA, T. (1975) Culture of Protoplasts from Chimeral Plant Tissue of Nature, *Japanese Journal of Genetics* 50: 417-420
- KHERA, P. und TILNEY-BASSETT, R. (1976) Fine Structural Observations of Embryo Development in *Pelargonium x Hortorum* BAILEY: with Normal and Mutant Plastids, *Protoplasma* 88: 7-23
- KIEŁCZEWSKI, J. (1989) Induktion von Plastommutationen und ihre Nutzung für histogenetische Untersuchungen zur Stabilität von Sproßscheitelschichten, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, D
- KIM, S., OH, S., IN, D. und LIU, J. (2003) Plant regeneration of rose (*Rosa hybrida*) from embryogenic cell-derived protoplasts, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 15-19
- KIRK, J und TILNEY-BASSETT, R. (1978) *The Plastids*, Elsevier, Amsterdam, NL
- KOOP, H., EIGEL, L. und SPÖRLEIN, B. (1992) Protoplasts in organelle research: Transfer and transformation of plastids, *Physiologia Plantarum* 85: 339-344
- KRAUSE, K., MAIER, R., KOFER, W., KRUPINSKA, K. und HERRMANN, R. (2000) Disruption of plastid-encoded RNA-polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome, *Molecular and General Genetics* 263: 1022-1030
- KRISHNARAJ, S., BI, Y. und SAXENA, P. (1997) Somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation system for scented geraniums (*Pelargonium* sp. 'Frensham'), *PLANTA* 201: 434-440
- KUCKUCK, H. (1979) *Gartenbauliche Pflanzenzüchtung: Züchtung von Gemüse, Obst und Zierpflanzen*, Paray, Berlin, D

- KUROIWA, H., NISHIMURA, Y., HIGASHIYAMA, T. und KUROIWA, T. (2002) *Pelargonium* embryogenesis: cytological investigations of organelles in early embryogenesis from the egg to the two-celled embryo, *Sexual Plant Reproduction* 15: 1-12
- KUROIWA, T., KAWAZU, T., UCHIDA, H., OHTA, T. und KUROIWA, H. (1993) Direct evidence of plastid DNA and mitochondrial DNA in sperm cells in relation to biparental inheritance of organelle DNA in *Pelargonium zonale* by fluorescence/electron microscopy, *European Journal of Cell Biology* 62: 307-313
- LEON, P., ARROYO, A. und MACKENZIE, S. (1998) Nuclear Control of Plastid and Mitochondrial Development in Higher Plants, *Annual Reviews on Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 453-480
- LINDSAY, G., HOPPING, M., BINDING, H. und BURGE, G. (1995) Graft chimeras and somatic hybrids for new cultivars, *New Zealand Journal of Botany* 33: 79-92
- LIS-BALCHIN, M. (2002) Growing pelargoniums in the garden, conservatory and for shows, in: LIS-BALCHIN, M. *Geranium and Pelargonium*, 92-99, Taylor and Francis, London, GB
- LIU, J., XU, X. und DENG, X. (2005) Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82: 19-44
- LOLIES, F. (2002) Bunte Blätter, besondere Blüten, *Deutscher Gartenbau* 40: 10-11
- LÜTTGE, U., KLUGE, M. und BAUER, G. (1989) Botanik – Ein grundlegendes Lehrbuch, VCH, Weinheim, D
- MACHE, R. und LERBS-MACHE, S. (2001) Chloroplast genetic system of higher plants: Chromosome replication, chloroplast division and elements of the transcriptional apparatus, *Current Science* 80: 217-224
- MACKENZIE, S. und MCINTOSH, L. (1999) Higher Plant Mitochondria, *Plant Cell* 11: 571-586
- MADDEN, J., JONES, C. und AUER, C. (2005) Modes of regeneration in *Pelargonium x hortorum* (*Geraniaceae*) and three closely related species, *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 41: 37-46
- MAIER, M. und SCHMITZ-LINNEWEBER, C. (2004) Plastid Genomes in: DANIELL, H. und CHASE, C.: *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*, 115-150, Kluwer, Dordrecht, NL
- MALONE, R., HORVATH, G., CSÉPLO, A., BUZAS, B., DIX, P. und MEDGYESY, P. (1992) Impact of the stringency of cell selection on plastid segregation in protoplast fusion-derived *Nicotiana* regenerates, *Theoretical and Applied Genetics* 84: 866-873
- MANUELL, A., BELIGNI, M., YAMAGUCHI, K. und MAYFIELD, S. (2004) Regulation of chloroplast translation: interactions of RNA elements, RNA-binding proteins and the plastid ribosome, *Biochemical Society Transactions* 32: 601-605

- MARCOTRIGIANO, M. (1997) Chimeras and Variegation: Patterns of Deceit, *HortScience* 32: 773-784
- MARCOTRIGIANO, M. und GOUIN, F. (1984) Experimentally synthesized plant chimeras – 1. *In vitro* recovery of *Nicotiana tabacum* L. chimeras from mixed callus cultures, *Annals of Botany* 54: 503-511
- MARCOTRIGIANO, M. und HACKETT, G. (2000) Nitrosomethylurea Induces Nuclear and Cytoplasmic Chlorophyll Mutations in *Nicotiana glauca* Graham, *Annals of Botany* 86: 293-298
- METZLAFF, M., BÖRNER, T. und HAGEMANN, R. (1981) Variations of Chloroplast DNAs in the Genus *Pelargonium* and their Biparental Inheritance, *Theoretical and Applied Genetics* 60: 37-41
- METZLAFF, M., POHLHEIM, F. und BÖRNER, T. (1982) Hybrid Variegation in the Genus *Pelargonium*, *Current Genetics* 5: 245-249
- MITHILA, J., MURCH, S., KRISHNARAJ, S. und SAXENA, P. (2001) Recent advances in *Pelargonium in vitro* regeneration systems, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 1-9
- MÖHRING, H. (1949) *Pelargonien: ihre Entwicklung, Züchtung und Kultur, Kulturen für den Blumen- und Zierpflanzenbau* 1, Deutsche Gärtnerbörse, Aachen, D
- MONTEIRO, W. (2002) Quantitative Analyse der Beteiligung genetisch verschiedener internaler Sprossscheitelschichten (L2, L3) an der Bildung des Blattmesophylls – ein Beitrag zum Konkurrenzverhalten genetisch verschiedener Gewebe, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, D (<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/monteiro-octave-william-ademola-2002-07-31/PDF/Monteiro.pdf>)
- MOREJOHN, L., BUREAU, T., MOLÈ-BAJER, J., BAJER, A. und FOSKET, D. (1987) Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization *in vitro*, *Planta* 172: 252-264
- MORRISSETTE, N., MITRA, A., SEPT, D. und SIBLEY, D. (2004) Dinitroanilines Bind alpha-Tubulin to Disrupt Microtubules, *Molecular Biology of the Cell* 15: 1960-1968
- MÜLLER, A. (1964) Mutationsauslösung durch Nitrosomethylharnstoff bei *Arabidopsis*, *Der Züchter* 34: 102-120
- MURASHIGE, T. und SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- MURCH, S., KRISHNARAJ, S. und SAXENA, P. (1997) Thidiazuron-induced morphogenesis of Regal geranium (*Pelargonium domesticum*): A potential stress response, *Physiologia Plantarum* 101: 183-191
- MURTHY, B., SINGH, R. und SAXENA, P. (1996) Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* BAILEY cv Ringo Rose) cotyledonary cultures, *Plant Cell Reports* 15: 423-426

NASSER, N. und TILNEY-BASSETT, R. (1992) The inheritance of patterned white flowers in zonal pelargoniums, *Journal of Horticultural Science* 67: 361-370

NASSOUR, M. und DORION, N. (2002) Plant regeneration from protoplasts of micropropagated *Pelargonium x hortorum* 'Alain': effect of some environmental and medium factors on protoplast system efficiency, *Plant Science* 163: 169-176

NASSOUR, M. und DORION, N. (2003) Somatic Hybridization between *Pelargonium x hortorum* and *P. x domesticum*. Towards Resistance to *Xanthomonas pelargonii*, *Acta Horticulturae* 612: 75-81

NASSOUR, M., VALLADE, P., BENJOUIRA, H. und DORION, N. (2001) Protoplast isolation and colony formation from leaf protoplasts of three cultivars of *Pelargonium x domesticum*, 20th International Eucarpia Symposium, B, "Strategies for new ornamentals", Book of Abstracts: 44-45

NASSOUR, M, CHASSÉRIAUX, G. und DORION, N. (2003) Optimization of protoplast-to-plant system for *Pelargonium x hortorum* 'Alain' and genetic stability of the regenerated plants, *Plant Science* 165: 121-128

NEGRUTIU, I., BIASINI, G., POTRYKUS, I., SALA, F. und SHILLITO, R. (1987) Hybrid Genes in the Analyses of Transformation Conditions. 1. Setting Up a Simple Method for Direct Gene-Transfer in Plant-Protoplasts, *Plant Molecular Biology* 8: 363-373

NOGUCHI, T., HIRATA, Y. und YAGISHITA, N. (1992) Intervarietal and interspecific chimera formation by *in vitro* graft-culture methods in *Brassica*, *Theoretical and Applied Genetics* 83: 727-732

NOZAWA, G. und HIRATA, Y. (2002) Synthesis and Utilization of *in vitro* Artificially Synthesized Chimeras, *Combined Proceedings of the International Plant Propagators' Society* 52: 346-353

OLBRICHT, K. (1998) Untersuchungen zur genetischen und histogenetischen Variabilität an transgenen *Petunia hybrida* Hort. (VILM.), Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, D (<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/agrar/olbricht-klaus/PDF/Olbricht.pdf>)

OLBRICHT, K., PLASCHIL, S. und POHLHEIM, F. (2006) Causes of Flower Colour Patterns with a Focus on Chimeral Patterns, *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* 1: 311-319

pac® Elsner Jungpflanzen (1998) pac® Pelgardini®-Schmuckblattpelargonien, *Zierpflanzenbau* 6: 268-270

pac® Elsner Jungpflanzen (2001) Katalog 2001/2002, D, (www.pac-elsner.com)

PALMER, J. (1985) Comparative Organization of Chloroplast Genomes, *Annual Reviews of Genetics* 19: 325-354

PALMER, J (1991) Plastid Chromosomes: Structure and Evolution, in: BOGORAD, L. und VASIL, I.: *The Molecular Biology of Plastids*, 5-53, Academic Press, New York, USA

- PALMER, J., NUGENT, J. und HERBON, L. (1987) Unusual structure of *Geranium* chloroplast DNA – A triple-sized inverted repeat, extensive gene duplications, multiple inversions, and 2 repeat families, *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 84: 769-773
- PHILIPPI, G. (1961) Untersuchungen über die Fertilitätsverhältnisse einiger Kulturformen von *Pelargonium zonale*, *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 44: 380-402
- PLASCHIL, S. (1997) Vergleichende Untersuchungen zur histogenetisch bedingten Sternmusterbildung in der Petalenfärbung bei *Camellia* L., *Myosotis* L., *Pelargonium* L'HÉRIT. ex AIT., *Phlox* L., *Rhododendron* L., *Saintpaulia* H. WENDL., *Verbena* L., Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, D (<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/agrar/plaschil-sylvia/PDF/Plaschil.pdf>)
- PLASCHIL, S., OLBRICHT, K. und POHLHEIM, F. (2003) Flower Colour Patterns for Ornamental Purposes, *Acta Horticulturae* 612: 61-66
- POHLHEIM, E. (1977) Untersuchungen zur Mutationsauslösung und Mutagenitätstestung an einem monohaploiden Klon von *Pelargonium zonale* (L.) L'HÉRIT. ex AIT., Dissertation, Pädagogische Hochschule „Karl Liebknecht“, Potsdam, D
- POHLHEIM, F. (1969) Über Unterschiede in der Beteiligung des „Dermatogens“ an der Mesophyllbildung bei *Buxus sempervirens argenteo-marginata* hort., *Wissenschaftliche Zeitschrift der Pädagogischen Hochschule Potsdam* 1: 167-176
- POHLHEIM, F. (1970) *Prunus pissardi* 'Hessei'-eine Trichimäre, *Flora* 159: 435-449
- POHLHEIM, F. (1973) Untersuchungen zur periklinalchimärischen Konstitution von *Pelargonium zonale* 'Freak of Nature', *Flora* 162: 284-294
- POHLHEIM, F. (1977) Umlagerungen an der Trichimäre *Pelargonium zonale* 'Freak of Nature' – ein Beitrag zur Herstellung von Plastommutanten, *Wissenschaftliche Zeitschrift der Pädagogischen Hochschule Potsdam* 21: 115-127
- POHLHEIM, F. (1981a) Genetischer Nachweis einer NMH-induzierten Plastommutation bei *Saintpaulia ionantha* H. WENDL., *Biologische Rundschau* 19: 47-50
- POHLHEIM, F. (1981b) Induced Mutations for Investigation of Histogenetic Processes as the Basis for Optimal Mutant Selection, *Induced Mutations – a tool in plant breeding*, IAEA, A, 489-495
- POHLHEIM, F. (1983) Vergleichende Untersuchungen zur Änderung der Richtung von Zellteilungen in Blattepidermen, *Biologisches Zentralblatt* 102: 323-336
- POHLHEIM, F. (1986) Hybrid Variegation in Crosses between *Pelargonium zonale* (L.) L'HÉRIT. ex AIT. and *Pelargonium inquinans* (L.) L'HÉRIT. ex AIT., *Plant Breeding* 97: 93-96
- POHLHEIM, F. (1992) Induktion von Pfropfheterohistonten bei *Populus*, *Vorträge für Pflanzenzüchtung* 22: 291-298

- POHLHEIM, F. (2003) Vergleichende Untersuchungen zur Sprossvariation bei *Plectranthus L'HÉRIT.* (*Lamiaceae*), Feddes Repertorium 114: 488-496
- POHLHEIM, F. (2004) Doppelmarkierung – eine Methode zur Heterohistontenanalyse, Vorträge für Pflanzenzüchtung 63: 187-192
- POHLHEIM, F. und BEGER, B. (1974) Erhöhung der Mutationsrate im Plastom bei *Saintpaulia* durch N-Nitroso-N-Methylharnstoff, Biologische Rundschau 12: 204-206
- POHLHEIM, F. und RÖSSEL, K. (1989) Partnerinduktion bei chimärischen Blatt- und Blütenfarbmustern von *Pelargonium*, Tagungsberichte der Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR 281: 107-115
- POHLHEIM, F., POHLHEIM, E. und GÜNTHER, G. (1972) Die haploide *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' als Testsystem für Mutagene, Wissenschaftliche Zeitschrift der Pädagogischen Hochschule Potsdam 16: 65-70
- PYKE, K., ZUBKO, M. und DAY, A. (2000) Marking cell layers with spectinomycin provides a new tool for monitoring cell fate during leaf development, Journal of Experimental Botany 51: 1713-1720
- QURESHI, J. und SAXENA, P. (1992) Adventitious shoot induction and somatic embryogenesis with intact seedlings of several hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum* BAILEY) varieties, Plant Cell Reports 11:443-448
- RAJAM, M. (1988) Plastid Mutations induced in Red Pepper by Nitrosomethyl Urea, Current Science 57: 436-428
- RÁKOSY-TICAN, L., HORNOK, M. und MENCZEL, L. (2001) An improved procedure for protoplast microelectrofusion and culture of *Nicotiana tabacum* intraspecific somatic hybrids: plant regeneration and initial proofs on organelle segregation, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 67: 153-158
- RAMULU, K., VERHOEVEN, H. und DIJKHUIS, P. (1991) Mitotic Blocking, Micronucleation, and Chromosome Doubling by Oryzalin, Amiprophos-Methyl, and Colchicine in Potato, Protoplasma 160: 65-71
- RAO, P. und SUPRASANNA, P. (1996) Methods to double haploid chromosome numbers, in: JAIN, S. SOPORY, S. und VEILLEUX, R.: *In vitro* Haploid Production in Higher Plants Vol.1, 317-339, Kluwer, Dordrecht, NL
- RAO, A., FAROOQUI, A. und SADANANDAM, A. (1997) Induction of lincomycin and streptomycin resistance by nitrosomethyl urea and ethylmethane sulphonate in *Capsicum annuum* L., Plant Cell Reports 16: 865-868
- REIDER, J. (1829) Beschreibung aller bekannten Pelargonien und Anleitung zur Erkennung und Kultur derselben, Nürnberg, D

- RENNER, O. (1936a) Zur Kenntnis der nichtmendelnden Buntheit der Laubblätter, *Flora* 130: 218-290
- RENNER, O. (1936b) Zur Entwicklungsgeschichte randpanaschierter und reingrüner Blätter von *Sambucus*, *Veronica*, *Pelargonium*, *Spiraea*, *Chlorophytum*, *Flora* 130: 454-466
- RÖBBELEN, G. (1963) Extranuclear Inheritance of Induced Plastid Mutations in *Arabidopsis thaliana*, *Genetics today*, Proceedings of the XI International Congress of Genetics Vol.1, 205-206, Den Haag, NL
- RÖBBELEN, G. (1965) Plastom Mutations, *Arabidopsis* Informations Service (AIS) 1(Supplement): 101-102
- ROBICHON, M., RENOU, J. und JALOUZOT, R. (1995) Genetic Transformation of *Pelargonium x hortorum*, *Plant Cell Reports* 15: 63-67
- ROBICHON, M., RENOU, J. und JALOUZOT, R. (1997) Plant regeneration of ivy leaved geranium through shoot organogenesis, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49: 209-212
- ROMEIS, B. und BÖCK, P. (1989) *Mikroskopische Technik*, Urban und Schwarzenberg, München, D
- ROSEN, W. (1954) Effects of Streptomycin on certain Green Plants, *The Ohio Journal of Science* 54: 73-78
- RÖSSEL, K. (1990) Genetische Markierungen zur quantitativen Musteranalyse an somatischen Varianten eines monohaploiden *Pelargonium*-Klones, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, D
- ROTH, L. (1927) Untersuchungen über die periklinal bunten Rassen von *Pelargonium zonale*, *Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre* 45: 125-159
- SAKAI, K., OZAKI, Y., URESHINO, K., MIYAJIMA, I. und OKUBO, H. (2004) Effectiveness of Inter-Ploid Crosses for Overcoming Plastome-Genome Incompatibility in Intersectional Crosses of Azaleas, *Acta Horticulturae* 651: 47-51
- SANAGO, M., MURCH, S., SLIMMON, T., KRISHNARAJ, S. und SAXENA, P. (1995) Morphoregulatory role of thidiazuron: morphogenesis of root outgrowths in thidiazuron-treated geranium (*Pelargonium x hortorum* BAILEY), *Plant Cell Reports* 15: 205-211
- SATINA, S., BLAKESLEE, A. und AVERY, A. (1940) Demonstration of the Three Germ Layers in the Shoot Apex of *Datura* by Means of Induced Polyploidy in Periclinal Chimeras, *American Journal of Botany* 27: 895-905
- SCHLEGEL, G. (1982) Untersuchungen zur *in vitro*-Mutagenese bei *Saintpaulia ionantha* H. WENDL. und *Pelargonium zonale*-Hybriden, Dissertation, Technische Universität München, D

- SCHMIDT, W. (1976) Holmes C. Miller's last Zonal Originations, including some from Colchicine-Treated Seeds, *Geraniums Around The World (GATW)* 14: 6-8
- SCHMITZ-LINNEWEBER, C., KUSHNIR, S., BABIYCHUK, E., POLTNIGG, P., HERRMANN, R. und MAIER, R. (2005) Pigment Deficiency in Nightshade/Tobacco Cybrids is Caused by the Failure to Edit the Plastid ATPase alpha-Subunit mRNA, *The Plant Cell* 17: 1815-1828
- SCHUM, A., HOFMANN, K., GHALIB, N. und TAWFIK, A. (2001) Factors affecting protoplast isolation and plant regeneration in *Rosa* spp., *Die Gartenbauwissenschaft* 66: 115-122
- SCHUMANN, G. (2005) Züchtungsforschung bei Pelargonien an der BAZ, *Gärtnerbörse* 17: 22-25
- SCHWAIER, R., NASHED, N. und ZIMMERMANN, F. (1968) Mutagen specificity in the induction of karyotic versus cytoplasmic respiratory deficient mutants in yeast by nitrous acid and alkylating nitrosamides, *Molecular Genetics and Genomics* 102: 290-300
- SHINOZAKI, K. und 22 Coautoren (1986) The Complete Nucleotide-Sequence of the Tobacco Chloroplast Genome – its Gene Organization and Expression, *EMBO Journal* 5: 2043-2049
- SINEIRO, J., DOMINGUEZ, H., Núñez, M. und LEMA, J. (1997) Inhibition of cellulase activity by sunflower polyphenols, *Biotechnology Letters* 19: 521-524
- SKIRVIN, R. und YANICK, J. (1976a) Chromosome Doubling and Reduction in *in vitro* and *in vivo* Systems, *HortScience* 11: 329
- SKIRVIN, R. und YANICK, J. (1976b) Tissue Culture-induced Variation in Scented *Pelargonium* spp., *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101: 281-290
- SMITH, L. (1915) Variegation in Pelargoniums, *Journal of the Royal Horticultural Society* 41, Proceedings XXXVI
- SOLTIS, D., SOLTIS, P. und TATE, J. (2003) Advances in the study of polyploidy since Plant speciation, *New Phytologist* 161: 173-191
- SPSS Inc. (2001) The SPSS TwoStep Cluster Component, White paper-Technical report, USA
- STEINER, K., BALDAUF, F. METZLAFF, M. und HAGEMANN, R. (1988) Comparative transcription analysis of higher plant plastome mutants, *Current Genetics* 14: 171-176
- STEWART, R., SEMENIUK, P. und DERMEN, H. (1974) Competition and Accomodation between Apical Layers and their Derivatives in the Ontogeny of Chimeral Shoots of *Pelargonium x hortorum*, *American Journal of Botany* 61: 54-67
- STOEBE, B. und MAIER, U. (2002) One, two, three: nature's tool box for building plastids, *Protoplasma* 219: 123-130
- TAKAMURA, T., LIM, K. und VANTUYL, J. (2002) Effect of a new compound on the mitotic polyploidization of *Lilium longiflorum* and oriental hybrid lilies, *Acta Horticulturae* 572: 37-42

- THAO, N., URESHINO, K., MIYAJIMA, I., OZAKI, Y. und OKUBO, H. (2003) Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 19-25
- THIELKE, C. (1948) Beiträge zur Entwicklungsgeschichte und zur Physiologie panaschierter Blätter, *Planta* 36: 2-33
- TILNEY-BASSETT, R. (1963a) The Structure of Periclinal Chimeras, *Heredity* 18: 265-285
- TILNEY-BASSETT, R. (1963b) Genetics and Plastid Physiology in *Pelargonium*, *Heredity* 18: 485-504
- TILNEY-BASSETT, R. (1970) Effect of Environment on Plastid Segregation in Young Embryos of *Pelargonium x hortorum* BAILEY, *Annals of Botany* 34: 811-816
- TILNEY-BASSETT, R. (1976) The control of plastid inheritance in *Pelargonium* IV, *Heredity* 37: 95-107
- TILNEY-BASSETT, R. (1986) *Plant Chimeras*, Baltimore Edward Arnold Ltd., London, GB
- TILNEY-BASSETT, R. (1988) Inheritance of plastids in *Pelargonium*, *Seminar Series* 35: 115-129
- TILNEY-BASSETT, R. (1991) Genetics of Variegation and Maternal Inheritance in Ornamentals, in: HARDING, J.: *Genetics and breeding of ornamental species*, 226-245, Kluwer, Dordrecht, NL
- TILNEY-BASSETT, R. und ALMOUSLEM, A. (1989) Variation in plastid inheritance between *Pelargonium* cultivars and their hybrids, *Heredity* 63: 145-153
- TILNEY-BASSETT, R., ALMOUSLEM, A und AMOATEY, H. (1992) Complementary genes control biparental inheritance in *Pelargonium*, *Theoretical and Applied Genetics* 85: 317-324
- TILNEY-BASSETT, R., MUNSHI, A., ALMOUSLEM, A. und NASSER, N. (1995) The inheritance of red, salmon, rose-pink and soft-pink flowers in zonal pelargoniums, *Journal of Horticultural Science* 70: 499-508
- TRIBOUSH, S., DANILENKO, N., ULITCHEVA, I. und DAVYDENKO, O. (1999) Location of induced mutations and reversions in the chloroplast genome of *Helianthus annuus*, *Plant Growth Regulation* 27: 75-81
- UCHNEAT, M., SPICER, K. und CRAIG, R. (1999) Differential Response to Floral Infection by *Botrytis cinerea* within the Genus *Pelargonium*, *HortScience* 34: 718-720
- USATOV, A., MASHKINA, E. und GUS'KOV, E. (2005) The Effect of Oxidative Stress on Nitrosomethylurea-Induced Mutagenesis in Sunflower *Helianthus annuus* L., *Russian Journal of Genetics* 41: 63-70
- VAN TUYL, J. und LIM, K. (2003) Interspecific Hybridisation and Polyploidization as Tools in Ornamental Plant Breeding, *Acta Horticulturae* 612: 13-22

- VAROTTO, S., NENZ, E., LUCCHIN, M. und PARRINI, P. (2001) Production of asymmetric somatic hybrid plants between *Cichorium intybus* L. and *Helianthus annuus* L., Theoretical and Applied Genetics 102: 950-956
- VENKATAIAH, P., CHRISTOPHER, T. und SUBHASH, K. (2005) Induction and characterization of streptomycin-resistant mutants in *Capsicum praetermissum*, Journal of Applied Genetics 46: 19-24
- VERHOEVEN, H. und BLAAS, J. (1988) Direct cell to cell transfer of mitochondria by microinjection, in: PUIITE, K., DONS, J., HUIZING, H., KOOL, A., KOORNEEF, A. und KRENS, F.: Progress in plant protoplast research, 299-300, Kluwer, Dordrecht, NL
- VERHOEVEN, H. und BLAAS, J. (1992) Direct cell to cell transfer of organelles by microinjection, Plant Cell Reports 10: 613-616
- VISSER, C., QURESHI, J., GILL, R. und SAXENA, P. (1992) Morphoregulatory role of thidiazuron-substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyls culture, Plant Physiology 99: 1704-1707
- WALBOT, V. und COE, E. (1979) Nuclear gene iojap conditions a programmed change to ribosome-less plastids in *Zea mays*, Proceedings of the National Academy of Science, USA 76: 2760-2764
- WEGNER, J. (1998) Untersuchungen zur Schichtenstruktur des angiospermen Sproßscheitels und zur Entstehung von Variegationsmustern bei besonderer Berücksichtigung des Histogenese-verlaufs L1-bürtiger Gewebe im Laubblatt, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, D
- WEGNER, J. (2000a) A theoretical approach to the genesis of cell layer arrangements in undifferentiated tissues, Plant Sciences 153: 177-183
- WEGNER, J. (2000b) Empirical investigations into the tunica structuring point of the shoot apex of *Pelargonium zonale*, Plant Science 153: 171-175
- WEGNER, J. (2003a) On the developmental analogy of the shoot apex and the leaf margin and the genesis of L1-derived mesophyll areas in the leaf margin, Plant Science 164: 565-569
- WEGNER, J. (2003b) On the histogenesis of L1-derived tissue in the leaf – empirical investigations into the mantle structuring point, Plant Science 164: 571-578
- WIMMER, C. (2001) Barocke Pelargonien, Gartenpraxis 1: 50-55
- WIMMER, C. (2002) Entwicklung der Pelargonien im 19. Jahrhundert, Gartenpraxis 1: 18-23
- WINKELMANN, T., KAVIANI, K. und SEREK, M. (2005) Development of a shoot regeneration protocol for genetic transformation in *Pelargonium zonale* and *Pelargonium peltatum* hybrids, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 33-42
- WINKLER, H. (1916) Über die experimentelle Erzeugung von Pflanzen mit abweichenden Chromosomenzahlen, Zeitschrift für Botanik 8: 417-531

- YAMAGUCHI, K. und SUBRAMANIAN, A. (2000) The Plastid Ribosomal Proteins – Identification of All the Proteins in the 50 S Subunit of an Organelle Ribosome (Chloroplast), *The Journal of Biological Chemistry* 275: 28466-28482
- YAMAGUCHI, K., VON KNOBLAUCH, K. und SUBRAMANIAN, A. (2000) The Plastid Ribosomal Proteins – Identification of All the Proteins in the 30 S Subunit of an Organelle Ribosome (Chloroplast), *The Journal of Biological Chemistry* 275: 28455-28465
- YARROW, S., COCKING, E. und POWER, J. (1987) Plant regeneration from cultured cell-derived protoplasts of *Pelargonium aridum*, *P. x hortorum* and *P. peltatum*, *Plant Cell Reports* 6: 102-104
- YU, S. (1995) Intersubgeneric Protoplast Fusion of *Pelargonium aridum* (*Ligularia*) and *P. zonale* (*Ciconium*), *Korean Journal of Plant Tissue Culture* 22(6): 311-316
- ZANG-KUAL, U., KEY-ZUNG, R., IN-SUP, S. und KYUNG-AE, H. (1993) DNA-mediated gene transfer in plant protoplasts, *Journal of the Korean Agricultural and Chemical Society* 36: 557-561
- ZLESK, D., THILL, C. und ANDERSON, N. (2005) Trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa chinensis* minima (SIMS) VOSS seedlings, *Euphytica* 141: 281-290
- ZONNEVELD, B. und VAN IREN, F. (2000) Flow cytometric analysis of DNA content in *Hosta* reveals ploidy chimeras, *Euphytica* 111: 105-110
- ZUBKO, M. und DAY, A. (1998) Stable albinism induced without mutagenesis: a model for ribosome-free plastid inheritance, *The Plant Journal* 15: 265-271
- ZUBKO, M. und DAY, A. (2002) Differential regulation of genes transcribed by nucleus-encoded plastid RNA polymerase, and DNA amplification, within ribosome-deficient plastids in stable phenocopies of cereal albino mutants, *Molecular Genetics and Genomics* 267: 27-37

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 'Mrs Pollock', in einer Abbildung von 1862, Flores des Serres, 15	8
Abbildung 2 'Melosilver', Katalogabbildung, pac® Elsner Jungpflanzen	10
Abbildung 3 Übersicht: <i>Pelargonium</i> , Sprossscheitel- und Laubblattaufbau	12
Abbildung 4 Entmischungsvarianten aus einer zygotischen Mischzelle	15
Abbildung 5 Methodische Ansätze zur Züchtung periklinalchimärischer Laubblattvarianten	17
Abbildung 6 Züchtung von <i>Pelargonium</i> -Laubblattvarianten mit tetraploiden Gewebekomponenten, kombinationszüchterischer Ansatz	21
Abbildung 7 Tetraploide Variante von <i>Pelargonium zonale</i>	29
Abbildung 8 Hybridvariegater Spross aus einem Kreuzungsprogramm unter Beteiligung von <i>P. articulatum</i> (4x)	29
Abbildung 9 In Kreuzungen verwendete diploide Weißrandpelargonien, Sortenübersicht	30
Abbildung 10 <i>In vitro</i> Veredelungsverfahren	37
Abbildung 11 Weißer, bröseliger Kallus, wie er zum Aufbau von Suspensionen verwendet wurde	37
Abbildung 12 Chimärisches Ausgangsmaterial, Indizien auf verschiedenen Ebenen	41
Abbildung 13 Variegater Sämling aus einer Kreuzung mit 'Sophie Dumaresque' (w x g)	42
Abbildung 14 Segregationsmuster an einer vierjährigen Pflanze aus grün x 'Contrast'	42
Abbildung 15 oben: 'Sophie Dumaresque' x grün, Laubblatt einer entstandenen Weißrandpflanze (links). Daneben Blätter der zwei spontan aufgetretenen Sprossvarianten. unten: Querschnitte aus Laubblattzentren der drei Formen. (siehe Text)	43
Abbildung 16 'Mrs Parker' (links) und Laubblatt einer GWG-Variante aus 'Mrs Parker' x grün	44
Abbildung 17 'Crystal Palace Gem', Selbstungsnachkommenschaft	44
Abbildung 18 Pollendurchmesser diploider Sorten im Vergleich zu tetraploiden Behandlungsvarianten	48
Abbildung 19 'F. of Spring', tetraporates Pollenkorn einer 4x-Variante (oben) und einer 2x-Vergleichspflanze	49
Abbildung 20 TwoStep Cluster-Analyse zu den Pollenmessungen (Abb. 18)	49
Abbildung 21 'Flower of Spring', Laubblattquerschnitt aus dem grünen Binnenfeld	49
Abbildung 22 'Flower of Spring', Variante mit tetraploider L2, Blattquerschnitt aus dem Binnenfeld	49
Abbildung 23 'Sophie Dumaresque', Spross mit tetraploider L2 (links)	50
Abbildung 24 'Wilhelm Langguth', Spross mit tetraploider L2 (rechts)	50
Abbildung 25 'Contrast', Spross mit tetraploider L2 (rechts)	50
Abbildung 26 'Flower of Spring', Spross mit tetraploider L2 (links)	50
Abbildung 27 'Westdale Appleblossom' mit vermutlich tetraploider L2 (links)	50
Abbildung 28 'Mrs Parker', histologische Befunde sprechen gegen eine Polyploidisierung der L2 des Variantensprosses (rechts)	50
Abbildung 29 Übergang aus dem weißen Randbereich (rechts) ins grüne Binnenfeld einer vermutlich L2-tetraploiden Behandlungsvariante aus 'W. Appleblossom' im Querschnitt	51
Abbildung 30 Blütengrößen ausgewählter Sorten und L2-tetraploider Varianten im Vergleich	51

Abbildung 31 'Contrast', Blütengrößen von Ploidievarianten im Vergleich.....	52
Abbildung 32 Sprossvariation an 'Frank Headley' nach Trifluralin-Behandlung. GGW- und GWW-Sektor auf einem Laubblatt. Die weiße Gewebekomponente ist tetraploid.	52
Abbildung 33 'H. of Snow', Laubblätter der Ausgangsform (oben) und einer in der L2 tetraploiden Variante	52
Abbildung 34 Stomatalängen von Ausgangsformen und epidermal tetraploiden Variantensprossen im Vergleich	53
Abbildung 35 TwoStep Cluster-Analyse der ermittelten Stomatawerte	54
Abbildung 36 'Bette Shellard', Epidermisabzüge, Ausgangsvariante (links) und eine Variante mit tetraploider Epidermis	54
Abbildung 37 'Hills of Snow', Schmalrandvariante (links), Ausgangsform (unten) und L2-tetraploider Trieb	55
Abbildung 38 'Mrs Pollock', Schmalrandspross	55
Abbildung 39 'Frank Headley', Ausgangsform (A), Schmalrandblätter (B), und 4x-L2-Variante (C) (vergl. Abb. 41).....	55
Abbildung 40 'Contrast', Laubblatt mit sektorial verengtem Rand entstanden an der Basis eines Schmalrandsprosses.....	55
Abbildung 41 Blattquerschnitte von 'Frank Headley' (links), der Variante mit tetraploider L2 (Mitte) sowie einer vermutlich L3-tetraploiden Form, gleiche Vergrößerung, jeweils aus dem grünen Binnenfeld (siehe Abb. 39).....	56
Abbildung 42 Laubblätter von 'Hills of Snow', vermutlich GWG/DDT (Mitte und Abb. 37+43), 'Frank Headley' GGW/DDT (links) und Sprossvariante 'Hills of Snow' GGW/DDD (siehe Abb. 12).....	56
Abbildung 43 'Hills of Snow' GWG, vermutlich DDT; Übergang vom weißen Randbereich (rechts) ins grüne Binnenfeld. Chlorophyllführende Zellen sind deutlich größer als vergleichbar positionierte farblose Zellen.....	57
Abbildung 44 'Mrs Pollock' TDT , Sprossscheitellängsschnitt, L1 und L3 mit vergrößerten Zellkernen.....	57
Abbildung 45 Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 44, Zellen mit zwei Nucleoli (x) liefern Hinweise auf eine Polyploidisierung (vergleiche: OLBRICHT 1998).....	57
Abbildung 46 Sämling aus 'Contrast 4x' x Sorte mit lang haltendem Mischzustand	59
Abbildung 47 'F. of Spring 4x' x Sorte, Sämling mit ungewöhnlich früher periklinalchimärischer Entmischung	59
Abbildung 48 Zonierte Laubblattvariante aus einer Kreuzung mit 'W. Langguth 4x'	61
Abbildung 49 Kreuzung mit 'F. of Spring 4x', Blütencharakter der 4x-Hochleistungssorten in Kombination mit variegatem Blattrand	61
Abbildung 50 Bislang einzige tetraploide Weißrandvariante ('Melo cherry' x 'W. Langguth 4x') mit grüner Mutter (WR aus 'Contrast 4x' unberücksichtigt)	62
Abbildung 51 Blütenfarbvariante (Red-Purple-Group 57A) aus einer Kreuzung mit 'W. Langguth 4x'	62
Abbildung 52 'F. of Spring 4x' x 'Sorte' Wurzelspitzenpräparat mit 30 zählbaren Chromosomen; ca. 1200x.....	62
Abbildung 53 Zwei WR-Varianten aus Kreuzungen mit 'Flower of Spring 4x' zeigen deutlich verschiedene Musterproportionen	63
Abbildung 54 WGG-Form aus einer Kreuzung mit 'Hills of Snow 4x' mit regelmäßigen, markanten L1-Beteiligungen am Aufbau der Laubblätter	64

Abbildung 55 Blatt eines GWW-Sprosses aus 'F. of Spring 4x' x Sorte, L1-Beteiligungen sichtbar	64
Abbildung 56 Zurückgeschnittener Spross einer Variante aus 'Frank Headley 4x' x Sorte	64
Abbildung 57 Austrieb eines xWG-Sprosses an der Schnittstelle aus Abb. 53.....	64
Abbildung 58 Sämlinge aus der Kreuzung <i>P. zonale</i> 4x x 'Juliane' mit sektorialen Variegationen	65
Abbildung 59 Laubblatt einer aus <i>P. zonale</i> 4x x 'Juliane' gewonnenen Periklinalchimäre	65
Abbildung 60 Prozentuale Anteile hybridvariegater Sämlinge in Abhängigkeit von der Kreuzungsrichtung	66
Abbildung 61 Sämling mit hybridvariegatem WR-Muster	67
Abbildung 62 WR-Blätter der hybridvariegaten Ausgangsform (links) und einer nach Kreuzung mit tetraploiden Sorten hervorgegangenen Variante, Winteraspekt.....	67
Abbildung 63 Weißer Austrieb an der Sorte 'Lauretta' im Anschluss an eine Spectinomycinbehandlung (100 mg/ml).....	68
Abbildung 64 Weißer Blütrieb der Sorte 'Robe', der in Kreuzungen verwendet wurde	68
Abbildung 65 Weißer Sämling aus 'F. Headley 4x' x Sorte	69
Abbildung 66 Hypokotylmittelsegment mit Adventivsprossen (ca.12x)	69
Abbildung 67 Sämlingsspitzenexplantat mit übergreifender Sektorbildung.....	69
Abbildung 68 Weiße und grüne Adventivsprosse an einem Mittelsegment	69
Abbildung 69 Entwicklung des SCV von Zellsuspensionen aus 'Viktoria' (blau) und 'Perlenkette Orange' (je 10ml Probenvolumen), im Vergleich eine log(3)-Wachstumskurve	70
Abbildung 70 Zelle aus einer 'Viktoria'-Kallussuspension, FDA-Färbung	70
Abbildung 71 Entwicklung der Trockenmasse von <i>Pelargonium</i> -Zellsuspensionen, gemittelte Werte.....	70
Abbildung 72 Protoplasten aus einer 'Viktoria'-Kallussuspension im Anschluss an eine gelungene Präparation.....	71
Abbildung 73 FDA-gefärbter 'Viktoria'-Protoplast mit (oben) und ohne Anregung	71
Abbildung 74 intakter Protoplast aus 'Lauretta'-Selbstung (Evans-Blau-Färbung)	71
Abbildung 75 Zellkolonie 9 Tage nach der Präparation.....	72
Abbildung 76 „Green Nodules“ auf einem TDZ-haltigem Medium.....	72
Abbildung 77 Gefäßdifferenzierungen in „Green Nodules“, Dünnschnittpräparat.....	72
Abbildung 78 Diploide Variante (2 mMol/5 h) mit photosensiblen weißen Rand.....	73
Abbildung 79 Tetraploide Behandlungsvariante (20 mMol/5 h) mit chlorophylldefekter L2	73
Abbildung 80 Diploide Behandlungsvariante (2 mMol/1h) mit geschecktem Blattrand. Das L3-bürtige Binnenfeld erscheint einfarbig.....	74
Abbildung 81 Pflanze aus Abb. 78 mit WR-Bildung.....	74
Abbildung 82 Variegates Laub an einer tetraploiden Behandlungsvariante (20 mMol/5h, links) und Segregationsmuster einer diploiden Kreuzung	74
Abbildung 83 NMH-Behandlungsvariante mit massiver „Ohren“-Bildung. Ein Objekt für histologische Folgeuntersuchungen.	74

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	<i>Pelargonium x zonale</i> , verbreitete blattvariegata Sorten und ihr Ursprung	8
Tabelle 2	Variegationsursachen innerhalb der Gattung <i>Pelargonium</i>	11
Tabelle 3	<i>Pelargonium x zonale</i> , genetisch untersuchte chlorophylldefekte Sorten	16
Tabelle 4	Publizierte NMH-Mutationsversuche (Überblick)	18
Tabelle 5	Überblick: Züchtung periklinalchimärischer <i>Pelargonium</i> -Formen mit tetraploiden Gewebekomponenten	24
Tabelle 6	Publizierte Polyploidisierungsverfahren innerhalb der Gattung <i>Pelargonium</i>	25
Tabelle 7	<i>Pelargonium x zonale</i> Sprossregenerationssysteme	26
Tabelle 8	Protoplastenkulturverfahren innerhalb der Gattung <i>Pelargonium</i>	27
Tabelle 9	Diploide <i>Pelargonium x zonale</i> -Weißrandvarianten und ihre Verwendung	31
Tabelle 10	Tetraploide <i>Pelargonium x zonale</i> -Hybriden aus Sortimenten von pac® Elsner Jungpflanzen, Dresden und ihre Verwendung	31
Tabelle 11	Nachweisverfahren für periklinalchimärische Laubblattvariegationen bei <i>Pelargonium</i> auf verschiedenen experimentellen Ebenen	33
Tabelle 12	Polyploidisierungsvarianten	34
Tabelle 13	Nachweisverfahren für Polyploidisierungserfolge auf verschiedenen experimentellen Ebenen	35
Tabelle 14	CPW, Cell and Protoplast Washing Solution; Enzymmix, Protoplastenmedium, Zusammensetzungen	38
Tabelle 15	Vitalitätsnachweise für Protoplasten und Zellsuspensionen	39
Tabelle 16	Antibiotika-Applikationsvarianten	40
Tabelle 17	Reziproke Kreuzungen variegater <i>P. x zonale</i> -Sorten mit grünen Testeltern	45
Tabelle 18	Kumulatives Ergebnis der Polyploidisierungsversuche (2001-2004)	46
Tabelle 19	Polyploidisierungserfolge detailliert	47
Tabelle 20	Ergebnisse reziproker Kreuzungen mit polyploidisierten L2-Varianten	58
Tabelle 21	Entwicklung variegater, tetraploider Sämlinge zu WR-Formen	60
Tabelle 22	Kreuzungen mit der tetraploiden Form aus <i>Pelargonium zonale</i>	65
Tabelle 23	Kreuzungen mit einer hybridvariegaten, tetraploiden Variante	66

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Methoden und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, 20. November 2006

Danksagung

Mein Dank gilt **Prof. Dr. F. Pohlheim** für den Entwurf der vielschichtigen Fragestellungen, mit denen ich mich in den zurückliegenden Jahren sehr gerne auseinandergesetzt habe. Seine wissenschaftlich fundierte Kritik, die vermittelten Denkanstöße sowie der gewährte Bearbeitungsfreiraum ermöglichten die vorliegende Dissertation.

Dr. Klaus Olbricht und **Dr. Sylvia Plaschil** danke ich für die aufmerksame Durchsicht meiner Entwürfe sowie für ihren Einsatz bei der Formulierung des AiF-Projektantrages, der meine experimentellen Arbeiten letztendlich auch finanziell möglich machte.

Mitarbeiter der Firma pac® Elsner Jungpflanzen, Dresden standen jederzeit mit fachkundigem Rat zur Seite. Die international erfolgreichen Sorten des Betriebes bildeten das Ausgangsmaterial für meine züchterischen Versuche.

Eine gartenbauwissenschaftliche Arbeit ist immer auch ein Gemeinschaftsprodukt.

Ohne die tatkräftige Mithilfe der **Mitarbeiterinnen des Fachgebietes Pflanzenzüchtung** sowie der **Versuchsstation des Institutes für Gartenbauwissenschaften der HU-Berlin** wäre die vorliegende Untersuchung nicht möglich gewesen.

Ihnen allen gebührt mein herzlicher Dank!

Familie, Freunde und Bekannte leisteten nicht nur auf emotionaler Ebene Beistand.

Gut, dass ich euch habe!